



**Marlene António  
Pereira**

**Influência das estruturas bacterianas externas na  
inativação fotodinâmica por uma porfirina catiónica**



## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.





**Marlene António  
Pereira**

**Influência das estruturas bacterianas externas na  
inativação fotodinâmica por uma porfirina catiónica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e co-orientação da Professora Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



Às minhas avós, que são agora os meus anjos da guarda





## **o júri**

presidente

### **Doutor João António de Almeida Seródio**

Professor Auxiliar no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

### **Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado Silva Neves**

Professora associada com Agregação no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

### **Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida** (orientadora)

Professora Auxiliar no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

À Professora Doutora Adelaide Almeida, orientadora da tese, pela sua disponibilidade e constante colaboração, pelo incentivo e dedicação a este trabalho.

Aos Professores do Grupo de Química Orgânica do Departamento de Química pela cedência das porfirinas e pelo apoio durante os ensaios de uptake.

À técnica Helena Dias pelo apoio técnico e logístico durante o trabalho laboratorial.

Às colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Aplicada, pela boa disposição e energia, pelo apoio laboratorial e pela disponibilidade. Em especial à Carla Pereira e à Eliana Alves, por muito me terem ajudado em várias fases do trabalho com o seu conhecimento mais alargado, e à Sandra Beirão e Sara Fernandes pela companhia de todas as horas, pela compreensão, apoio e incentivo. A todas agradeço pela simpatia e amizade que facilitaram a minha integração no grupo.

A todos os amigos em geral que, de uma forma ou de outra, me acompanharam neste percurso e que compreenderam e aceitaram as minhas ausências.

Aos meus pais e irmã pelo amor sem limites e união familiar. Por estarem sempre presentes apesar da distância, por serem compreensivos e, mais do que isso, os responsáveis por todo o meu percurso académico. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo carinho, por me incentivarem sempre e não me deixarem desistir. Obrigada por existirem na minha vida e por terem feito de mim o que sou hoje.

Ao Vitor por ter sido mais do que um companheiro, pela entrega, pela luta e pelo esforço. Por me ter ajudado a alcançar este objetivo, por estar sempre presente e, tal como os meus pais, não me ter deixado desistir. Por todo o amor, carinho e dedicação. E principalmente pelo constante apoio e incentivo.

Por último, às minhas avós que partiram no decorrer deste trabalho. Apesar dos momentos de tristeza que as suas partidas me causaram, sei que onde quer que estejam olham por mim e me guiam neste longo caminho.



## palavras-chave

Terapia fotodinâmica, porfirinas catiónicas, bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas, lípidos.

## resumo

Os principais alvos da inativação fotodinâmica (PDI) são as estruturas bacterianas externas, membrana citoplasmática e parede celular. Neste trabalho foi avaliado o efeito das estruturas bacterianas externas na eficiência da PDI. Para alcançar este objectivo foram seleccionadas 8 bactérias com estruturas externas distintas; 4 bactérias de Gram negativo (*Escherichia coli*, com estruturas externas típicas das bactérias de Gram negativo; *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* ambas com uma camada “S-layer” e *Rhodopirellula* sp., com uma parede celular de natureza proteica com menos peptidoglicano e com compartimentalização do citoplasma) e 4 bactérias de Gram positivo (*Staphylococcus aureus*, com estruturas externas típicas das bactérias de Gram positivo; *Truepera radiovictrix*, *Deinococcus geothermalis* e *Deinococcus radiodurans*, com uma parede celular espessa que lhes confere uma coloração de Gram positivo, mas que inclui uma segunda membrana complexa com múltiplas camadas e estruturalmente análoga à das bactérias Gram-negativas). Os estudos foram realizados na presença de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina tetraiodada (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) a 5.0 µM com luz branca (40 W m<sup>-2</sup>). A susceptibilidade de cada bactéria à PDI pela porfirina seleccionada mostrou ser dependente das estruturas externas bacterianas. Apesar de todas as bactérias Gram-positivas terem sido inactivadas até aos limites de detecção (redução de ~8 log) após 60-180 min de irradiação, a inactivação seguiu padrões distintos. Entre as bactérias de Gram negativo, a *E. coli* foi a única espécie a ser inactivada até ao limite de detecção (~8 log após 180 min). A eficiência de inactivação das duas espécies de *Aeromonas* foi semelhante (redução de ~5-6 log após 270 min). *Rhodopirellula* foi a menos susceptível (redução de ~4 log após 270 min). Como observado anteriormente, as bactérias de Gram positivo são mais facilmente inactivadas do que as estirpes de Gram negativo, e isto é também verdade para a *T. radiovictrix*, *D. geothermalis* and *D. radiodurans*, que têm uma parede celular complexa com várias camadas. Os resultados apoiam a teoria de que as estruturas celulares externas são importantes alvos bacterianos da PDI. A composição química das estruturas externas tem um efeito maior sobre a eficiência da PDI do que a complexidade e o número de camadas do revestimento externo, e os lípidos parecem ser um alvo importante da PDI.



## keywords

Photodynamic therapy, cationic porphyrins, Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, lipids.

## abstract

The main targets of photodynamic inactivation (PDI) are the external bacterial structures, cytoplasmic membrane and cell wall. In this work it was evaluated how the external bacterial structures influence the PDI efficiency. To reach this objective 8 bacteria with distinct external structures were selected; 4 Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, with typical Gram-negative external structures; *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* both with an S-layer and *Rhodopirellula* sp., with a peptidoglycan-less proteinaceous cell wall and with cytoplasm compartmentalization) and 4 Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, with typical Gram-positive external structures; *Truepera radiovictrix*, *Deinococcus geothermalis* and *Deinococcus radiodurans*, all with thick cell walls that give them Gram-positive stains, but including a second complex multilayered membrane and structurally analogous to that of Gram-negative bacteria). The studies were performed in the presence of 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetraiodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) at 5.0  $\mu\text{M}$  with white light ( $40 \text{ W m}^{-2}$ ). The susceptibility of each bacteria to PDI by Tetra-Py<sup>+</sup>-Me was dependent on bacteria external structures. Although all Gram-positive bacteria were inactivated to the detection limit (reduction of  $\sim 8$  log) after 60-180 min of irradiation, the inactivation followed distinct patterns. Among the Gram-negative bacteria, *E. coli* was the only species to be inactivated to the detection limit ( $\sim 8$  log after 180 min). The efficiency of inactivation of the two species of *Aeromonas* was similar (reduction of  $\sim 5$ -6 log after 270 min). *Rhodopirellula* was less susceptible (reduction of  $\sim 4$  log after 270 min). As previously observed, the Gram-positive bacteria are more easily inactivated than Gram-negative strains, and this is even true for *T. radiovictrix*, *D. geothermalis* and *D. radiodurans*, which have a complex multilayered cell wall. The results support the theory that the outer cell structures are major bacterial targets for PDI. Moreover, the chemical composition of the external structures has a stronger effect on PDI efficiency than complexity and the number of layers of the external coating, and lipids seem to be an important target of PDI.





## Índice

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| <b>Agradecimentos</b> .....    | i    |
| <b>Resumo</b> .....            | iii  |
| <b>Abstract</b> .....          | v    |
| <b>Índice de Figuras</b> ..... | xi   |
| <b>Índice de Tabelas</b> ..... | xi   |
| <b>Abreviaturas</b> .....      | xiii |

|  |    |
|--|----|
| <b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....                                 | 1  |
| 1.1 Terapia Fotodinâmica .....                                       | 3  |
| 1.2 Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana .....                     | 4  |
| 1.2.1 Fotossensibilizadores .....                                    | 5  |
| 1.2.2 Mecanismo de Fotoinativação .....                              | 6  |
| 1.3 Inativação Fotodinâmica de Bactérias Através de Porfirinas ..... | 8  |
| 1.3.1 Fotoinativação de Bactérias de Gram negativo.....              | 10 |
| 1.3.2 Fotoinativação de Bactérias de Gram positivo .....             | 11 |
| 1.4 Alvos Bacterianos da Inativação Fotodinâmica .....               | 12 |
| 1.4.1 Ácido Nucleico.....  | 13 |
| 1.4.2 Estruturas Externas.....                                       | 13 |
| 1.4.2.1 Membrana Citoplasmática.....                                 | 13 |
| 1.4.2.2 Parede Celular .....   | 14 |
| 1.5 Objectivos .....   | 16 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Capítulo 2 - Influence of external bacterial structures in the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin</b> ..... | 219 |
| 2.1 Introduction .....  | 21  |
| 2.2 Methods.....  | 23  |
| 2.2.1 Photosensitizer .....   | 23  |
| 2.2.2 Bacterial strains and growth conditions.....  | 24  |
| 2.2.3 Photoinactivation assays .....  | 24  |



|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.4 Cellular uptake of porphyrin.....                | 25        |
| 2.2.5 Statistical analysis .....                       | 25        |
| 2.3 Results.....                                       | 26        |
| 2.3.1 Photodynamic inactivation of bacterial cell..... | 26        |
| 2.3.2 Cellular uptake of porphyrin.....                | 28        |
| 2.4 Discussion .....                                   | 29        |
| <b>Referências.....</b>                                | <b>35</b> |



## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Fig 1</b> - Mecanismo de tipo I e tipo II. ....  | 7  |
| <b>Fig 2</b> - Estruturas dos sete derivados de porfirinas catiónicas utilizados por Alves <i>et al</i> na inativação de <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> . ....   | 10 |
| <b>Fig 3</b> - Representação esquemática das diferenças na estrutura da membrana citoplasmática e da parede celular entre bactérias de Gram (+) e de Gram (-). ....   | 15 |
| <b>Fig 4</b> - Representação esquemática das estruturas externas de <i>A. hydrophila</i> e <i>A. salmonicida</i> . ....   | 17 |
| <b>Fig 5</b> - Structure of the porphyrin used as photosensitizer in the photoinactivation tests. ....  | 24 |
| <b>Fig 6</b> - Variation of viability of <i>S. aureus</i> (A), <i>D. radiodurans</i> (B), <i>D. geothermalis</i> (C) and <i>T. radiovictrix</i> (D) after exposure to 5.0 $\mu\text{M}$ of Tetra-Py <sup>+</sup> -Me and irradiated with white light (380-700 nm) with an irradiance of 40 W m <sup>-2</sup> during 270 min. .... | 26 |
| <b>Fig 7</b> - Variation of viability of <i>E. coli</i> (A), <i>A. salmonicida</i> (B), <i>A. hydrophila</i> (C) and <i>Rhodopirellula</i> sp. (D) after exposure to 5.0 $\mu\text{M}$ of Tetra-Py <sup>+</sup> -Me and irradiated with white light (380-700 nm) with an irradiance of 40 W m <sup>-2</sup> during 270 min. ....  | 27 |
| <b>Fig 8</b> - Uptake of Tetra-Py <sup>+</sup> -Me by Gram-positive bacteria ( <i>S.aureus</i> , <i>D. radiodurans</i> , <i>D. geothermalis</i> and <i>T. radiovictrix</i> ) after 15 min of dark incubation at 25 °C in the presence of 5.0 $\mu\text{M}$ of Tetra-Py <sup>+</sup> -Me under stirring (~100 rpm). ....           | 28 |
| <b>Fig 9</b> - Uptake of Tetra-Py <sup>+</sup> -Me by Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. hidrophyla</i> and <i>Rhodopirellula</i> ) after 15 min of dark incubation at 25°C in the presence of 5.0 $\mu\text{M}$ of Tetra-Py <sup>+</sup> -Me under stirring (~100 rpm). ....                | 29 |

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Resultados obtidos por Alves <i>et al</i> na inativação de <i>E. coli</i> . ....     | 11 |
| <b>Tabela 2</b> - Resultados obtidos por Alves <i>et al</i> na inativação de <i>E. faecalis</i> . .... | 12 |



## Abreviaturas

|  |   |
|--|---|
| ANOVA  | Análise de variância  |
| aPDT   | Terapia fotodinâmica antibacteriana   |
| CFU  | Unidades formadoras de colónias   |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-CO <sub>2</sub> H <i>adj</i> | 5,10-bis(4-carboxyphenyl)-15,20-bis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrin di-iodide<br>5,10-bis(4-carboxifenil)-15,20-bis(1-metilpiridínio-4-il) porfirina di-iodada |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-CO <sub>2</sub> H <i>opp</i> | 5,15-bis(4-carboxyphenyl)-10,20-bis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrin di-iodide<br>5,15-bis(4-carboxifenil)-10,20-bis(1-metilpiridínio-4-il) porfirina di-iodada |
| DMSO   | Sulfóxido de dimetilo   |
| EDTA   | Ácido etilenodiaminotetraacético  |
| Gram (-)   | Gram negativo   |
| Gram (+)   | Gram positivo   |
| Log  | Logaritmo de base 10  |
| LPS  | Lipopolissacarídeos   |
| Mono-Py <sup>+</sup> -Me-Tri-CO <sub>2</sub> H         | 5-(1-methylpyridinium-4-yl)-10,15,20-tris(4-carboxyphenyl) porphyrin iodide<br>5-(1-metilpiridínio-4-il)-10,15,20-tris(4-carboxifenil) porfirina iodada           |
| O <sub>2</sub>   | Oxigénio molecular  |
| PBS  | Tampão fosfato salino   |
| PDI  | Inativação fotodinâmica   |
| PDT  | Terapia fotodinâmica  |
| PI   | Fotoinativação  |
| PMBN   | <i>Polymixin B nonapeptide</i>  |
| PS   | Fotossensibilizador   |
| ROS  | Espécies reactivas de oxigénio  |
| rpm  | Rotações por minuto   |
| SDS  | Dodecilsulfato de sódio   |
| Tetra-Py <sup>+</sup> -Me                              | 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide<br>5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina tetra-iodada                           |





|   |  |
|---|--|
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-CO <sub>2</sub> H   | 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)<br>porphyrin triiodide<br>5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(1-metilpiridinio-4-il)porfirina<br>triiodada             |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-CO <sub>2</sub> -Me | 5-(4-methoxycarbonylphenyl)-10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin triiodide<br>5-(4-metoxicarbonilfenil)-10,15,20-tris(1-metilpiridinio-4-il)<br>porfirina triiodada |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF                  | 5-(pentafluorophenyl)-10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)<br>porphyrin triiodide<br>5-(pentafluorofenil)-10,15,20-tris(1-metilpiridinio-4-il)porfirina<br>triiodada         |
| TSA   | <i>Tryptic soy agar</i>  |
| TSB   | <i>Tryptic soy broth</i>   |
| <sup>3</sup> O <sub>2</sub>                 | Oxigénio molecular no estado fundamental   |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>                 | Oxigénio singleto  |



## Capítulo 1

---

### Introdução



## 1.1 Terapia Fotodinâmica

O efeito fotodinâmico foi definido por Tappeiner e Jodlbauer, em 1907,<sup>1</sup> como o uso de uma fonte de luz (luz visível de comprimento de onda adequado), um agente oxidante (oxigénio molecular [ $^3\text{O}_2$ ]) e um agente intermediário, denominado fotossensibilizador (PS), capaz de absorver e transferir a energia da fonte de luz para o oxigénio molecular levando à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) altamente citotóxicas (oxigénio singleto [ $^1\text{O}_2$ ], peróxido de hidrogénio [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ], superóxido [ $\text{O}_2^-$ ], radical hidroxilo [ $-\text{OH}^\bullet$ ]). Estas espécies reativas induzem stress oxidativo nas células e tecidos causando-lhes danos ou levando à sua destruição completa.<sup>2-8</sup>

A era da fotossensibilização começou em 1900 com um estudante de medicina, Oscar Raab, que observou a morte de *Paramecium caudatum* após exposição à luz na presença do corante laranja de acridina. Ele descobriu que a utilização da luz e do corante era mais eficaz em conjunto do que utilizando a luz ou o laranja de acridina individualmente.<sup>9</sup> As primeiras experiências a usar o efeito fotodinâmico foram realizadas por Tappeiner e Jesionek, em 1903, em pacientes com doenças dermatológicas, através da aplicação de eosina como fotossensibilizador, obtendo bons resultados no tratamento da psoríase e cancro de pele.<sup>4,9-10</sup>

Décadas mais tarde, a terapia fotodinâmica (PDT), designação normalmente dada à terapia fotoquímica do cancro,<sup>2</sup> resurgiu com o aparecimento de um agente fototerapêutico denominado Photofrin<sup>®</sup>, um PS designado de 1ª geração amplamente usado na PDT clínica. Devido à sua prolongada fototoxicidade cutânea, à baixa selectividade para com o tecido tumoral e fraca absorção de luz na região dos 640 nm (zona do espectro electromagnético em que os tecidos são mais transparentes à penetração da luz)<sup>11</sup> foram desenvolvidos fotossensibilizadores de 2ª geração que apresentam forte absorvância entre 650-850 nm<sup>2,12</sup> e de 3ª geração em que o PS se encontra conjugado com anticorpos monoclonados.<sup>13</sup>

Desde os anos 90 a terapia fotodinâmica é aplicada na área clínica, tendo sido usada com sucesso no tratamento de vários tipos de tumores. No entanto, têm-se confirmado as suas potencialidades em outras aplicações como é o caso da oftalmologia; no tratamento da degeneração macular da retina causada pela idade,<sup>14</sup> na medicina dentária<sup>15-16</sup> e em dermatologia.<sup>8,17</sup>

## 1.2 Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana

Já há muitos séculos que se sabe que muitas doenças são causadas por microrganismos e nos últimos 150 anos tem aumentado o conhecimento sobre a forma como estas doenças se transmitem. A descoberta dos antibióticos foi um dos maiores progressos da medicina pois resultou no tratamento de doenças microbianas infecciosas potencialmente mortíferas.<sup>6-7</sup> Mas embora se tenha verificado uma redução muito grande no impacto destas doenças na saúde humana, o aparecimento de mecanismos de resistência contra os medicamentos antimicrobianos convencionais anteriormente altamente eficazes veio dificultar o tratamento e erradicação destas doenças. Uma mutação que permita ao microrganismo sobreviver na presença de um antibiótico depressa se torna predominante na população microbiana pois as bactérias replicam-se muito rapidamente.<sup>5-8</sup> Para além disso, os antibióticos tiveram um uso generalizado e, muitas vezes, foram prescritos inapropriada e exageradamente e os pacientes não completavam os tratamentos, pelo que o problema se agravou.<sup>18</sup> A bactéria de Gram positivo *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina, mostrou capacidade de adquirir resistência contra todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Devido ao seu mecanismo de ação sobre a parede celular, a vancomicina (antibiótico glicopeptídico) permaneceu como antibiótico de último recurso para bactérias de Gram positivo multi-resistentes.<sup>19</sup> Anos mais tarde, a *S. aureus* e os *enterococci* mostraram ser resistentes à vancomicina o que causa bastante preocupação actualmente, principalmente em ambientes de risco como os hospitais.<sup>19-20</sup>

Com o aumento da resistência aos antibióticos entre microrganismos patogénicos tornou-se imperativo o desenvolvimento de novos agentes e medidas terapêuticas que fossem mais eficientes, de baixo custo e para as quais hipoteticamente não se desenvolvessem resistências tão facilmente.<sup>4-7,21</sup> A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) surge como uma alternativa promissora para inativar células microbianas patogénicas<sup>6,21</sup> e já mostrou ser eficaz *in vitro* contra bactérias (incluindo estirpes multirresistentes), fungos, vírus e protozoários.<sup>4,22-27</sup> Esta terapia segue o mesmo princípio da terapia fotodinâmica e combina a ação de três elementos: um agente fotossensibilizador (PS), uma fonte de luz de comprimento de onda adequado e oxigénio molecular (O<sub>2</sub>).<sup>3,4,7,8</sup>

Contrastando com o que acontece com a PDT para o cancro, onde o fotossensibilizador é normalmente injetado na corrente sanguínea e se acumula no tumor, na aPDT para infeções localizadas a administração do PS é realizada localmente na área afetada, quer seja por aplicação tópica, instilação, injeção

intersticial ou por aerossóis.<sup>5,28</sup> As principais características da aPDT que a tornaram numa terapia tão promissora são: (i) amplo espectro de acção, já que o PS actua em bactérias, fungos, vírus e protozoários parasitas, (ii) eficácia independente da resistência a antibióticos, (iii) possibilidade de desenvolver protocolos de PDI que levam a uma redução da população do agente patogénico com poucos danos no tecido do hospedeiro, (iv) inexistência de indução de estirpes fotorresistentes após vários tratamentos, (v) pequena probabilidade de promover o aparecimento de mutagenicidade, (vi) disponibilidade de formulações que permitam um fornecimento rápido e específico do PS à área infetada, (vii) uso de fontes de luz de baixo custo para a ativação do agente fotossensibilizador.<sup>8</sup>

Atualmente a principal aplicação da aPDT é na área clínica onde é usada para a esterilização de sangue e seus componentes, como medida de prevenção de contaminações virais.<sup>4</sup> Várias investigações têm sido levadas a cabo para a sua aplicação na área ambiental mostrando a sua eficácia na destruição de bactérias fecais, endósporos e vírus em águas ambientais.<sup>22,25-27,29-31</sup> Esta abordagem tem sido considerada com grande potencial no tratamento de águas residuais, na desinfeção de água potável e em pisciculturas.<sup>28-30</sup>

### **1.2.1 Fotossensibilizadores**

Os fotossensibilizadores (PS) são normalmente moléculas aromáticas que são eficazes na formação de estados excitados tripleto de longa vida. Quando estas moléculas absorvem luz de uma certa energia podem sofrer uma transição electrónica para o estado excitado singleto.<sup>4</sup> Dependendo da estrutura e do ambiente molecular, a molécula pode então perder a sua energia, por processos físicos ou electrónicos, voltando assim ao estado fundamental, ou pode sofrer uma transição para o estado excitado tripleto.<sup>4,5</sup> Neste estado de excitação a molécula pode reagir segundo dois mecanismos, tipo I e tipo II.

Um agente fotossensibilizador com características para ser usado em aPDT deve apresentar elevado rendimento quântico para a formação de estados tripleto e de espécies citotóxicas de oxigénio.<sup>8</sup> Outras características de um bom PS incluem: (i) boa capacidade de absorção no comprimento de onda da região do espectro em que a fonte de luz emite, (ii) boa eficiência para produzir ROS e fotoestabilidade, (iii) apresentar um mecanismo de inativação celular que torne mínimo o risco de desenvolvimento de estirpes resistentes e de processos mutagénicos.<sup>7</sup>

Diferentes classes químicas de PS positivamente carregados foram testadas com sucesso contra bactérias de Gram (+) e de Gram (-), incluindo fenotiazinas, ftalocianinas e porfirinas.<sup>4,24</sup> As porfirinas são o PS mais utilizado na aPDT, sendo compostas por quatro subunidades de tipo pirrólico ligadas entre si por quatro pontes metínicas, formando um macrociclo tetrapirrólico.

Estes macrociclos são pigmentos que ocorrem naturalmente e que estão envolvidos em processos biológicos como a respiração, a fotossíntese, cadeias transportadoras de electrões, ações enzimáticas e processos de desintoxicação.<sup>32</sup> O grupo heme é um exemplo de porfirina que contém no seu interior um átomo de ferro e pode ser encontrado em proteínas como a hemoglobina e a mioglobina, sendo responsável pelo transporte de oxigénio na corrente sanguínea, e em citocromos onde participa na transferência de electrões e na produção de energia da célula. Outro exemplo é a clorofila, molécula vital para a fotossíntese nas plantas.

As porfirinas podem então ser divididas em dois grupos: macrociclos de origem natural e seus derivados modificados e derivados tetrapirrólicos sintéticos, que se podem apresentar na forma neutra, catiónica ou aniónica. Estas porfirinas sintéticas podem ser transformadas em entidades catiónicas através da inserção de substituintes positivamente carregados nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrólico (posições *meso*), o que pode afectar em grande medida a cinética e o grau de ligação com a célula microbiana.<sup>8</sup> As porfirinas *meso*-tetra-*aril*ssubstituídas são o tipo de PS de eleição na inativação de microrganismos patogénicos.<sup>28</sup>

### 1.2.2 Mecanismo de Fotoinativação

O mecanismo de fotoinativação inicia-se com a absorção de um fóton de luz pelo PS, o que acontece se o máximo de absorção da porfirina for igual ao comprimento de onda da radiação incidente. A energia da luz absorvida pelo fotossensibilizador origina uma excitação da porfirina do estado fundamental singleto ( $S_0$ ) para um estado excitado singleto ( $S_1$ ) extremamente instável e de tempo de vida muito curto.<sup>4</sup> O PS excitado pode voltar ao estado fundamental, quer seja por fluorescência quer seja por conversão interna, perdendo energia sob a forma de calor, ou pode passar ao estado excitado tripleto ( $T_1$ ) com um tempo de vida mais longo. Uma vez no estado tripleto, o PS pode reagir segundo dois tipos de reacção oxidativa, conhecidos como mecanismo de tipo I e tipo II (Fig. 1), sendo o mecanismo de tipo II predominante em relação ao de tipo I para o grupo das porfirinas.



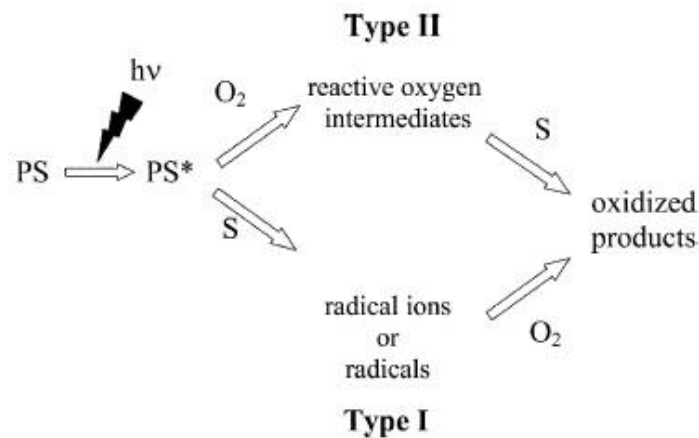


Fig 1 - Mecanismo de tipo I e tipo II.<sup>17</sup>

No mecanismo de tipo I o PS no estado tripleto reage diretamente com as moléculas que lhe estão próximas, por processos de transferência de electrões, formando iões radicais que podem reagir com o oxigénio molecular ( $O_2$ ) e produzir espécies citotóxicas (tais como o radical superóxido e/ou hidróxilo) que originam reações em cadeia de radicais livres.<sup>33</sup> O mecanismo de tipo II envolve a transferência de energia do PS no estado tripleto para o oxigénio molecular (tripleto -  $^3O_2$ ) produzindo estados excitados de oxigénio singleto ( $^1O_2$ ) que é muito reativo e interage eficientemente com várias biomoléculas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e lípidos.<sup>4-6,9,34</sup> Ambos os processos levam portanto à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS – oxigénio singleto e radicais livres), capazes de alterar irreversivelmente componentes vitais das células, causando danos oxidativos letais no alvo biológico.<sup>6</sup>

Durante este processo o PS não é destruído e pode voltar ao estado fundamental sem que seja quimicamente alterado. Assim o PS mantém-se activo e repete o processo de transferência de energia várias vezes. Uma vez que é regenerado, podem-se formar várias moléculas de oxigénio singleto a partir da mesma molécula de PS desde que estejam presentes luz e oxigénio molecular.<sup>7</sup>

### 1.3 Inativação Fotodinâmica de Bactérias Através de Porfirinas

A aPDT emergiu como alternativa para o problema das bactérias multi-resistentes, tendo sido realizados vários estudos para avaliar os fatores que influenciam o efeito fotodinâmico:<sup>4</sup> tipo de célula bacteriana, fotossensibilizador utilizado e fonte de luz.

Várias classes de PS têm sido testadas com sucesso como agentes fotoinativadores contra bactérias Gram (+) e Gram (-). Devido às suas interessantes propriedades físicas e químicas, os derivados porfirínicos provaram ser um bom PS para a aPDT,<sup>35</sup> principalmente na área clínica.

Para além das aplicações clínicas, as porfirinas começaram a ser utilizadas na área ambiental apresentando um enorme potencial nomeadamente na desinfecção de águas, no tratamento de águas residuais e em piscicultura.<sup>22,25,28</sup> Para um uso sustentável desta técnica a nível ambiental devem ser considerados vários aspectos: (i) a possibilidade de remoção do PS após o tratamento por aPDT de forma a recuperá-lo e reutilizá-lo, impedindo também a sua libertação para o meio ambiente, (ii) a estabilidade do PS sob as condições e fonte de irradiação, (iii) a toxicidade do PS para os organismos, tendo em atenção o impacto desta terapia nas comunidades de microrganismos naturais não-patogénicos.<sup>6,22,23</sup>

O padrão de susceptibilidade de bactérias de Gram (+) e Gram (-) à aPDT tem sido estudado com vários PS mostrando que estas reagem de forma diferente à fotoinativação. No geral, as bactérias de Gram (-) apresentam uma menor sensibilidade à aPDT do que as de Gram (+) pois apresentaram menor permeabilidade membranar.<sup>5</sup> No entanto, é possível utilizar substâncias (tais como  $\text{CaCl}_2$ , EDTA ou PMBN – polymixin B nonapeptide) que alteram a consistência da membrana externa e aumentam a sua permeabilidade, provocando a destabilização dos constituintes da parede celular e permitindo a passagem do PS para o interior da célula.<sup>7,8,36-38</sup>

Outra forma de facilitar a inativação eficiente de bactérias de Gram (-) é utilizando PS catiónicos que interagem com os componentes da membrana externa, auxiliando a ligação do PS à célula bacteriana.<sup>24-25,39-41</sup> As porfirinas catiónicas mostraram ser mais eficientes tanto na fotoinativação de bactérias de Gram (-) como de Gram (+) do que os derivados neutros e aniónicos.<sup>22</sup> Vários estudos demonstraram que os derivados de porfirinas catiónicas são capazes de induzir a PI de bactérias de Gram (+) e Gram (-).<sup>7,24,25,38-40</sup> e alguns deles compararam a eficiência de porfirinas sintéticas catiónicas *meso*-substituídas com diferente distribuição de carga (tetra-, tri-, di- ou monocatiónicas).<sup>24,40-42</sup> Os resultados não são, no entanto, concensuais pois

Merchat, Bertolini et al.<sup>40</sup> mostraram que porfirinas tetracatiónicas são um PS eficiente tanto contra bactérias Gram (+) como Gram (-) sob luz visível e, posteriormente, Merchat *et al.*<sup>24</sup> e Banfi *et al.*<sup>39</sup> verificaram que algumas porfirinas di- e tricatiónicas eram mais eficientes que as tetracatiónicas tanto contra estirpes Gram (+) como duas estirpes Gram (-). Recentemente Lazzeri et al.<sup>41</sup> testaram uma porfirina dicatiónica e duas tricatiónicas com grupos trifluorometilo que se revelaram PS eficazes contra *E. coli*.

Alves *et al.*<sup>23</sup> compararam também um conjunto de derivados porfirínicos mono-di-, tri- e tetra-catiónicos contra *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e concluíram que as porfirinas com três e quatro cargas eram mais eficientes contra as duas estirpes. Para além disso, testaram a distribuição das cargas dos grupos periféricos e a natureza dos grupos *meso*-substituintes mostrando que estes factores alteram o carácter anfifílico das porfirinas, podendo aumentar a afinidade do PS para a célula bacteriana e, consequentemente, a eficiência da fotoinativação.<sup>23</sup>

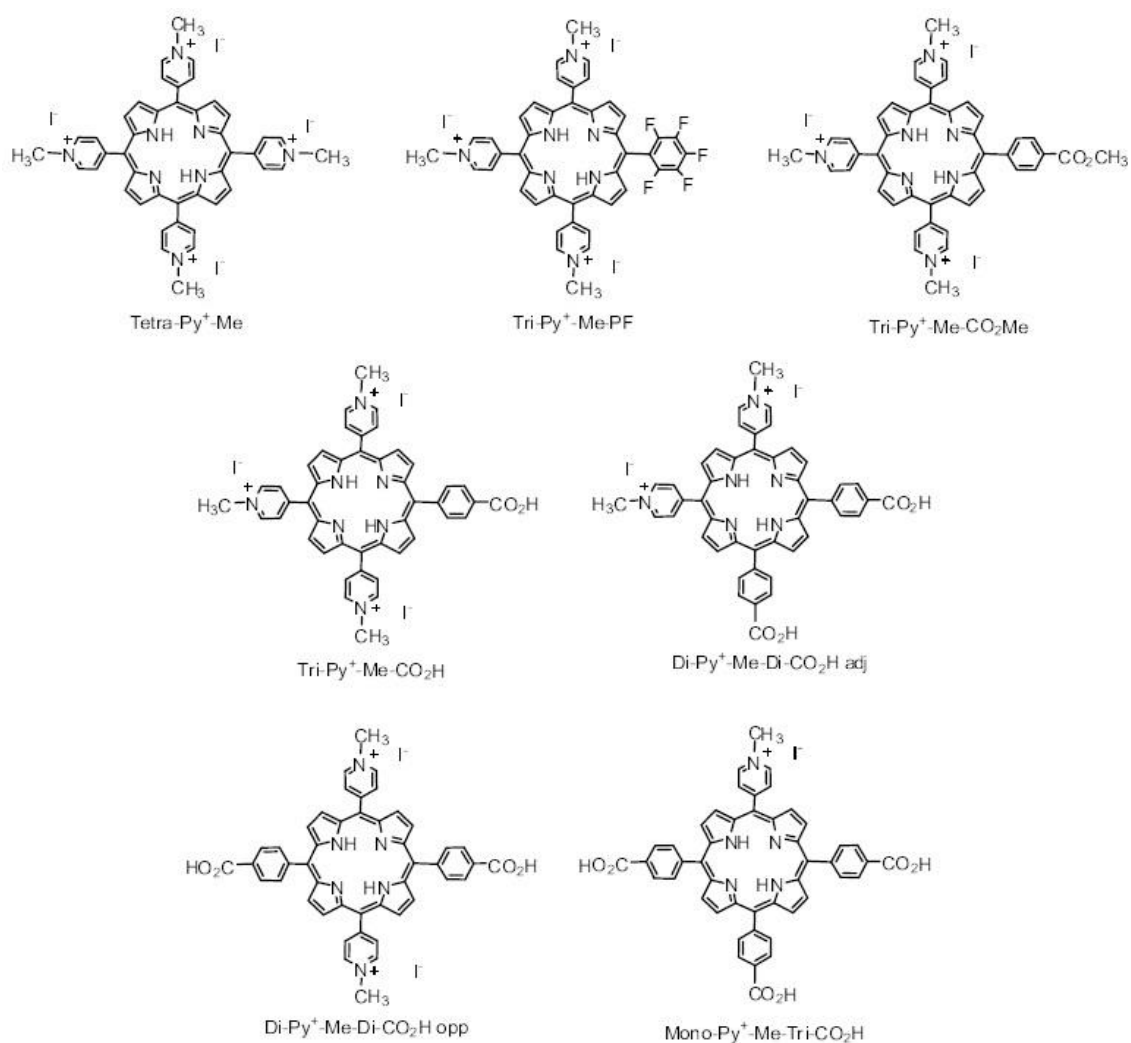
Lopes *et al.*<sup>42</sup> testaram cinco porfirinas mono-, di-, tri- e tetra-catiónicos em *E. coli* para avaliar se os fosfolípidos eram afetados após a PDT pelo número e posição das cargas na porfirina. Para além disso, consideraram a possibilidade de verificar se a eficiência do PS se refletia na oxidação dos fosfolípidos. Os resultados mostraram que todos os PS testados afectaram os lípidos da membrana da *E. coli* e confirmaram que ocorreu a foto-oxidação dos fosfolípidos após irradiação, e que os perfis de oxidação dos fosfolípidos acompanharam a eficiência da inativação.<sup>42</sup> Tal como em estudos anteriores, Lopes *et al* demonstraram que o número e posição das cargas no PS influencia o processo de aPDT já que as porfirinas com três e quatro cargas mostraram ser mais eficazes na fotoinativação da *E. coli*. Mostraram ainda a relevância dos lípidos da membrana celular como alvos da fotossensibilização com porfirinas catiónicas.<sup>42</sup>

Já foi demonstrado que a fotossensibilidade das bactérias é afectada pelo seu estado fisiológico uma vez que as células na sua fase logarítmica de crescimento são consideravelmente mais susceptíveis à PI do que na fase estacionária.<sup>4,8</sup> Para além disso, a densidade celular também afeta o processo de PI uma vez que as células competem para se ligarem ao PS disponível assim como para reagirem com as espécies citotóxicas geradas.<sup>44</sup> Por último, o aumento da concentração do PS também aumenta a velocidade de inativação, isto até se atingir o ponto de saturação do PS a partir do qual o processo não apresentará maior taxa de inactivação.<sup>28</sup>

### 1.3.1 Fotoinativação de Bactérias de Gram negativo

Como referido anteriormente as bactérias de Gram (-) são menos suscetíveis à aPDT por porfirinas, sendo mesmo resistentes à ação de porfirinas neutras ou carregadas negativamente.<sup>24,36,40,45</sup> Esta resistência deve-se à presença de uma membrana externa altamente organizada, composta por duas camadas lipídicas, que dificulta a interação do PS com a membrana citoplasmática e impede a passagem das espécies reativas de oxigénio por ele geradas.<sup>40,41</sup>

Alves *et al*<sup>23</sup> comparou a eficiência de sete porfirinas catiónicas (Fig. 2) com diferentes grupos *meso*-substituintes, número de cargas e distribuição das cargas na inativação de *E. coli*, bactéria de Gram (-) típica. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela seguinte (Tabela 1).



**Fig 2** - Estruturas dos sete derivados de porfirinas catiónicas utilizados por Alves *et al* na inativação de *E. coli* e *E. faecalis*.<sup>23</sup>

Tabela 1 - Resultados obtidos por Alves *et al* na inativação de *E. coli*.<sup>23</sup>

| PS Usado   | Concentração ( $\mu\text{M}$ ) | Redução (log 10) | Fluência de Luz ( $\text{J cm}^{-2}$ ) |
|--|--------------------------------|------------------|--|
| Tetra-Py <sup>+</sup> -Me                              | 0.5                            | ~1               | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~3               | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | 7.5              | 64.8                                   |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF                             | 0.5                            | ~4               | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | 7                | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | >7               | 21.6                                   |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-CO <sub>2</sub> Me             | 0.5                            | ~4.5             | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~5               | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | >7               | 21.6                                   |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-CO <sub>2</sub> H              | 0.5                            | 0                | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~1.5             | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | 5.18             | 64.8                                   |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-CO <sub>2</sub> H <i>adj</i> | 0.5                            | 2.4              | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~3               | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | 3.               | 64.8                                   |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-CO <sub>2</sub> H <i>opp</i> | 0.5                            | ~0.5             | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~3               | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | 3.77             | 64.8                                   |
| Mono-Py <sup>+</sup> -Me-Tri-CO <sub>2</sub> H         | 0.5                            | 0                | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~0.5             | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | 3.28             | 64.8                                   |

Os PS mais eficazes contra *E. coli* foram os tricatiônicos Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tri-Py<sup>+</sup>-Me-CO<sub>2</sub>Me que causaram uma redução de mais de 7 log na máxima concentração (5.0  $\mu\text{M}$ ) e com tempos de incidência de luz mais curtos. A porfirina tetracatiônica também se mostrou eficaz na máxima concentração (redução de 7.5 log) embora com uma maior fluência de luz.

### 1.3.2 Fotoinativação de Bactérias de Gram positivo

A maior susceptibilidade das bactérias de Gram (+) à PDI deve-se à espessa camada de peptidoglicano. Esta parede celular exhibe um grau relativamente alto de porosidade não atuando como barreira de permeabilidade para a maioria dos PS.<sup>8</sup>

Tal como para a *E. coli*, Alves *et al*<sup>23</sup> testou *Enterococcus faecalis* sob as mesmas condições. Os resultados são apresentados a seguir (Tabela 2).

**Tabela 2** - Resultados obtidos por Alves *et al* na inativação de *E. faecalis*.<sup>23</sup>

| PS Usado   | Concentração ( $\mu\text{M}$ ) | Redução (log10) | Fluência de Luz ( $\text{J cm}^{-2}$ ) |
|--|--------------------------------|-----------------|--|
| Tetra-Py <sup>+</sup> -Me                              | 0.5                            | 5.07            | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | 7.33            | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | 7.35            | 14.4                                   |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF                             | 0.5                            | ~6.8            | 14.4                                   |
|  | 1.0                            | ~6.8            | 14.4                                   |
|  | 5.0                            | ~6.8            | 14.4                                   |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-CO <sub>2</sub> Me             | 0.5                            | ~7              | 42.5                                   |
|  | 1.0                            | ~7              | 21.6                                   |
|  | 5.0                            | ~7              | 14.4                                   |
| Tri-Py <sup>+</sup> -Me-CO <sub>2</sub> H              | 0.5                            | ~5              | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~6.5            | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | ~7              | 21.6                                   |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-CO <sub>2</sub> H <i>adj</i> | 0.5                            | 7.03            | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | 7.03            | 42.5                                   |
|  | 5.0                            | 7.03            | 42.5                                   |
| Di-Py <sup>+</sup> -Me-Di-CO <sub>2</sub> H <i>opp</i> | 0.5                            | 0.88            | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~3.5            | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | ~7              | 64.8                                   |
| Mono-Py <sup>+</sup> -Me-Tri-CO <sub>2</sub> H         | 0.5                            | ~7              | 64.8                                   |
|  | 1.0                            | ~7              | 64.8                                   |
|  | 5.0                            | ~7              | 64.8                                   |

Como se pode ver pela tabela acima, as três porfirinas tricatiónicas e a porfina tetracatiónica foram o PS mais eficaz contra *E. faecalis* com redução de ~7 log para a concentração mais alta (5.0  $\mu\text{M}$ ) num menor tempo de incidência de luz. No entanto, todas as porfirinas deste estudo foram eficazes contra *E. faecalis*.<sup>23</sup>

#### 1.4 Alvos Bacterianos da Inativação Fotodinâmica

Os principais alvos da atividade fotodinâmica são as estruturas bacterianas externas, a parede celular e a membrana celular.<sup>28</sup> Os danos nas estruturas microbianas externas podem envolver perda do conteúdo celular ou inativação de sistemas de transporte de membrana e de enzimas.<sup>5,6,28,46,47</sup> Os danos nos ácidos nucleicos não são o principal mecanismo da inativação fotodinâmica bacteriana.<sup>28,48</sup>

### 1.4.1 Ácido Nucleico

Várias experiências mostraram que o tratamento de bactérias com vários PS e fontes de luz levam a danos no DNA, tanto em cadeias simples como em cadeias duplas e tanto em Gram (+) como Gram (-).<sup>5,49,50</sup> Há algumas evidências de que os PS que mais facilmente se conseguem intercalar no DNA de cadeia dupla mais facilmente provocam danos, sendo que os resíduos de guanina são os mais facilmente oxidados.<sup>5</sup> Estes danos produzidos nas cadeias de DNA podem eventualmente ser reparados por vários sistemas de reparação de DNA.<sup>51</sup> No entanto, vários autores concluíram que apesar de ocorrerem danos no DNA, esta pode não ser a principal causa de morte das células bacterianas.<sup>5,6,52</sup> Um argumento que o comprova é que o *Deinococcus radiodurans*, bactéria conhecida por ter um eficiente mecanismo de reparação do DNA, é facilmente inativado pela aPDT.<sup>6,53</sup>

Para além do DNA, já foram detectados danos ao nível do RNA extraído de *E. coli* após tratamento com peróxido de hidrogénio.<sup>48</sup> Vários factores são descritos como possíveis intervenientes na acção fotodinâmica das porfirinas sobre os ácidos nucleicos bacterianos: (i) Estrutura do PS, (ii) mecanismo de acção do PS (tipo I e/ou tipo II), (iii) localização celular do PS, (iv) ligação do PS à célula bacteriana, (v) concentração do PS, (vi) dose de luz e (vii) estirpe bacteriana.<sup>48</sup>

### 1.4.2 Estruturas Externas

A parede e as membranas celulares são o principal alvo da inativação fotodinâmica. Uma adesão específica e adequada do PS a estas estruturas é normalmente considerada suficiente para a destruição da célula alvo. Assim, as células não têm hipótese de desenvolver resistência, seja interrompendo o *uptake* ou aumentando a desintoxicação metabólica através do transporte das substâncias tóxicas para o exterior da célula.<sup>6,21</sup>

#### 1.4.2.1 Membrana Citoplasmática

Valduga *et al*<sup>64</sup> apontaram os danos nas proteínas, tanto da membrana externa como da membrana citoplasmática, como um importante efeito da fotossensibilização da *E. coli*. As alterações das proteínas da membrana externa são bastante selectivas: enquanto que algumas mantêm uma parte da sua atividade, outras perdem completamente a sua atividade e outras não são significativamente afectadas. De qualquer forma tais modificações da membrana externa podem causar um aumento da permeabilidade das células às porfirinas usadas na fotoinativação.<sup>54</sup> As proteínas da

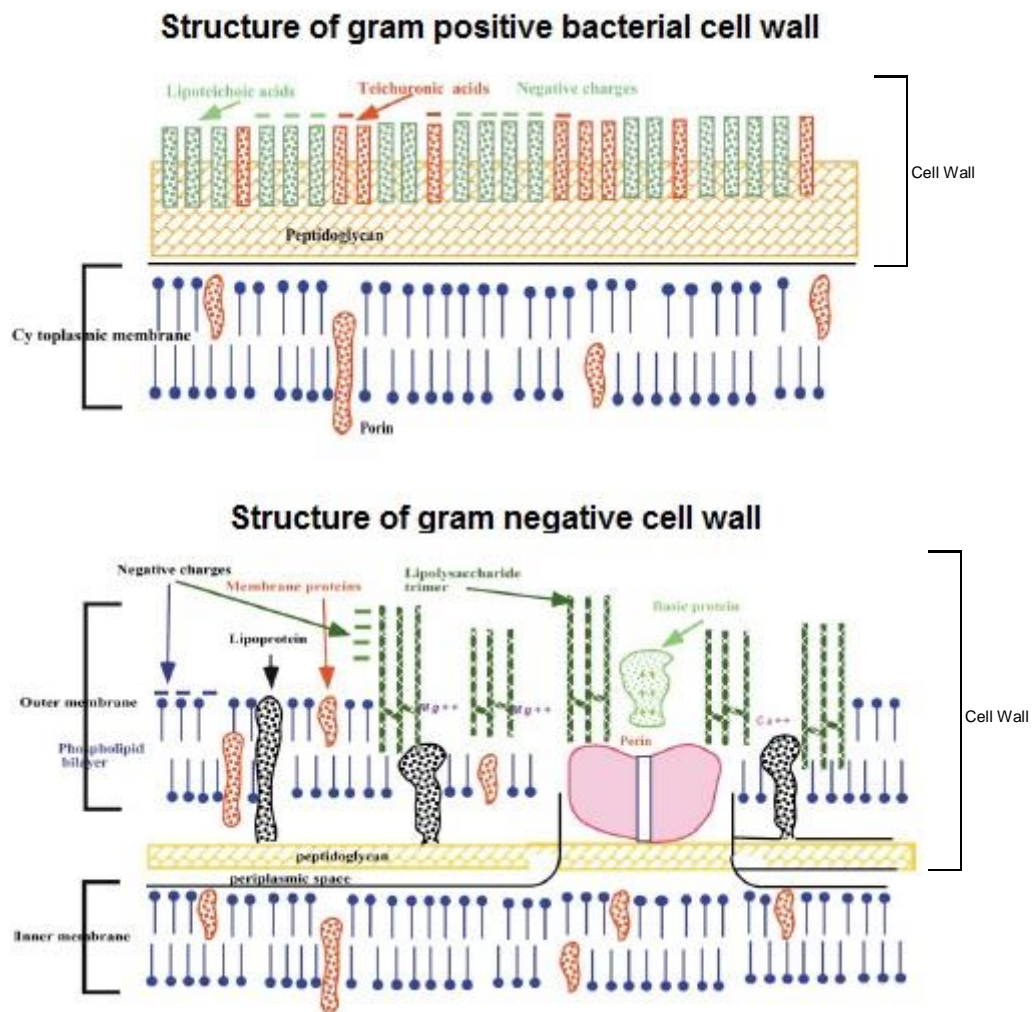
membrana citoplásmica são também danificadas pela fotoinativação com um certo grau de seletividade.<sup>54</sup>

#### **1.4.2.2 Parede Celular**

A principal diferença entre as bactérias de Gram (+) e Gram (-) reside na diferente constituição da parede celular (Fig 3). Enquanto as bactérias Gram (+) têm uma densa camada de peptidoglicano, composto por várias camadas individuais e homogêneas de peptidoglicano que envolvem a membrana celular, as bactérias Gram (-) têm apenas uma fina camada de peptidoglicano à volta da membrana celular que é depois circunscrita por uma membrana externa adicional, com uma estrutura lipídica assimétrica, composta por fosfolípidos, lipossacarídeos negativamente carregados e lipoproteínas ligadas ao peptidoglicano e grandes proteínas com função de porinas.<sup>8,17,55,56</sup> As porinas estão presentes em pequena quantidade e são responsáveis por restringir a penetração de várias substâncias, tais como antibióticos.<sup>55,56</sup>

Esta membrana externa é o que verdadeiramente distingue os dois tipos de bactérias pois actua eficazmente como uma barreira de permeabilidade à passagem de substâncias de elevado peso molecular (tais como proteínas) para o interior da célula, embora seja permeável a moléculas de menores dimensões como péptidos e monossacarídeos. Esta permeabilidade seletiva da membrana refere-se também à carga eléctrica dos compostos que a podem transpor.<sup>5,8</sup> A carga positiva na molécula do PS promove uma forte interacção electrostática com os locais negativamente carregados da superfície externa das células bacterianas, aumentando a eficiência da aPDT.<sup>23</sup>





**Fig 3** – Representação esquemática das diferenças na estrutura da membrana citoplasmática e da parede celular entre bactérias de Gram (+) e Gram (-).<sup>5</sup>

Arrojado *et al*<sup>57</sup> utilizaram uma porfirina tri-catiônica para avaliar a aplicabilidade da aPDT na inativação de oito bactérias patogênicas de peixes em aquaculturas. A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF foi eficaz contra todas as bactérias selecionadas (tanto as Gram (+) como as Gram (-)) causando, na maioria dos casos, a inativação até ao limite de detecção.<sup>57</sup> A única exceção foi a bactéria de Gram negativo *Aeromonas salmonicida* que ao fim de 270 min de exposição à luz, cerca de 1 log das células sobreviveu. Esta menor eficiência da aPDT pode ser justificada pela presença, nesta bactéria, de uma “S-layer” composta por unidades de proteína A com um arranjo tetragonal e contínuo sobre a superfície da célula.<sup>57-59</sup> Os diferentes perfis de inativação entre as outras bactérias de Gram negativo também podem ser associadas com as diferenças na parede celular pois, embora a maioria das Gram (-) apresentem

uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa, a composição desta membrana varia entre as bactérias.<sup>57</sup>

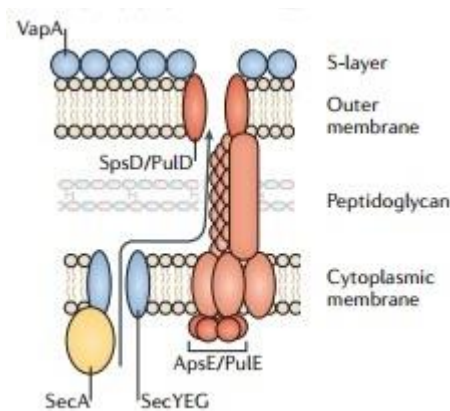
## 1.5 Objetivo do trabalho

O efeito das características externas invulgares de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo na eficiência da fotoinativação ainda não é conhecido. O objectivo deste estudo foi avaliar como é que estas estruturas externas influenciam a eficiência da aPDT usando a porfirina tetracatiónica 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina tetraiodada (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me), um PS padrão bem conhecido, a 5.0 µM sob luz branca artificial.<sup>26,27,57,60-62</sup> Para alcançar este objectivo, foram seleccionadas oito bactérias com estruturas externas distintas: quatro bactérias de Gram negativo (*Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* e *Rhodopirellula* sp.) e quatro bactérias de Gram positivo (*Staphylococcus aureus*, *Truepera radiovictrix*, *Deinococcus geothermalis* e *Deinococcus radiodurans*). Estas bactérias foram submetidas a aPDT e a cinética de inativação foi estudada.

Das bactérias utilizadas neste estudo, a *E. coli* apresenta uma estrutura externa típica das Gram (-) constituída por duas camadas. A parede externa apresenta uma membrana adicional, externamente à rede de peptidoglicano, com uma composição muito heterogénea que inclui proteínas com função de purinas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas que conferem à superfície externa uma carga negativa quase contínua.<sup>8</sup> Este sistema altamente organizado inibe a penetração de elementos humorais e celulares de defesa do hospedeiro e desencadeia mecanismos de resistência contra vários antibióticos, normalmente eficazes contra bactérias de Gram (+).<sup>8,63</sup>

Outras bactérias de Gram (-) estudadas foram as do género *Aeromonas*: *A. salmonicida* e *A. hydrophila* que apresentam uma “S-layer” (Fig. 4) que cobre a totalidade da célula, sendo a sua componente mais externa. Esta camada de duas dimensões consiste numa matriz paracristalina tetragonal regularmente ordenada composta por uma única espécie de proteínas – a proteína A.<sup>58,59</sup> A “S-layer” foi identificada na superfície de um grande número de espécies bacterianas mas, na maioria dos casos, a sua função é desconhecida. Foi proposto que a “S-layer” pode desempenhar um papel na determinação da forma, como uma barreira de permeabilidade e na protecção da célula contra proteases e agentes ambientais

nocivos.<sup>59</sup> Para além disso, fornece proteção constitutiva contra a morte oxidativa pelo que pode ser o primeiro factor a determinar a sobrevivência do género *Aeromonas*.<sup>58</sup>



**Fig 4** - Representação esquemática das estruturas externas de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*.<sup>64</sup>

Foi também alvo deste estudo a bactéria *Rhodopirellula* sp., uma Gram (-) do filo *Planctomycetes* com propriedades morfológicas únicas. A parede celular dos *Planctomycetes* não contém peptidoglicano como polímero estrutural principal e, em vez disso, é composta por proteínas.<sup>65,66</sup> Esta parede celular exhibe estruturas crateriformes, pequenas fossas que aparecem como regiões circulares electrónicas.<sup>65</sup> No entanto, a característica morfológica mais impressionante dos *Planctomycetes* é a sua compartimentalização. O citoplasma é dividido por uma membrana intracitoplasmática simples que separa o parifoplasma periférico sem ribossomas do riboplasma interno com ribossomas. O DNA dos *Planctomycetes* é altamente condensado e forma um nucleóide fibrilar dentro do riboplasma.<sup>65,66</sup>

O *Staphylococcus aureus*, também estudado neste trabalho, apresenta uma estrutura externa típica das Gram (+) com uma única camada. A parede externa contém mais de 100 camadas de peptidoglicano que estão intimamente associadas com ácidos lipoteicóicos e teicurónicos negativamente carregados. Esta parede apresenta um grau relativamente alto de porosidade pois permite a passagem de várias macromoléculas para a membrana plasmática interna.<sup>8</sup>

Para além do *S. aureus* foram também estudadas outras bactérias de Gram (+) tais como *Truepera radiovictrix*, *Deinococcus geothermalis* e *Deinococcus radiodurans*. Estas bactérias apresentam uma parede celular espessa que lhes confere comportamento Gram (+) mas possuem também uma segunda membrana complexa composta por várias camadas o que as torna estruturalmente próximas das bactérias Gram (-). A *T. radiovictrix* mostra uma membrana citoplasmática simétrica de três camadas e uma parede celular com três camadas distintas: a camada mais interna

(L1) aparece como uma camada fina eléctron-densa; a camada mais externa (L3) é uma camada espessa eléctron-densa homogénea excepto no que toca à sua superfície irregular; e entre estas duas, há uma camada transparente com material fibrilar (L2). É também visível um espaço periplásmico entre a membrana citoplasmática e a camada L1 da parede celular.<sup>67</sup> Foram feitas tentativas para detetar e identificar o tipo de peptidoglicano, mas sem sucesso. Quanto aos lípidos polares consistem de uma complexa mistura de glicolípidos e fosfolípidos.<sup>67</sup>

*D. geothermalis* possui uma membrana citoplasmática assimétrica de três camadas rodeada por uma parede celular com uma camada mais interna altamente eléctron-densa e uma superfície externa enrugada.<sup>68</sup>

O revestimento celular de *D. radiodurans* consiste de, pelo menos cinco camadas: a membrana citoplasmática; uma camada rígida e relativamente espessa de peptidoglicano com perfurações; uma camada compartimentalizada; a camada interior e a camada frágil e macia com subunidades hexagonais.<sup>69-70</sup>

Cite this: DOI: 10.1039/c3pp50408e

## Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin

M. A. Pereira,<sup>a</sup> M. A. F. Faustino,<sup>b</sup> J. P. C. Tomé,<sup>b,c</sup> M. G. P. M. S. Neves,<sup>b</sup> A. C. Tomé,<sup>b</sup> J. A. S. Cavaleiro,<sup>b</sup> Â. Cunha<sup>a</sup> and A. Almeida<sup>a</sup>

The main targets of photodynamic inactivation (PDI) are the external bacterial structures, cytoplasmic membrane and cell wall. In this work it was evaluated how the external bacterial structures influence the PDI efficiency. To reach this objective 8 bacteria with distinct external structures were selected; 4 Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, with typical Gram-negative external structures; *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* both with an S-layer and *Rhodopirellula* sp., with a peptidoglycan-less proteinaceous cell wall and with cytoplasm compartmentalization) and 4 Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, with typical Gram-positive external structures; *Truepera radlovictrix*, *Deinococcus geothermalls* and *Deinococcus radiodurans*, all with thick cell walls that give them Gram-positive stains, but including a second complex multi-layered membrane and structurally analogous to that of Gram-negative bacteria). The studies were performed in the presence of 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetralodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) at 5.0 µM with white light (40 W m<sup>-2</sup>). The susceptibility of each bacteria to PDI by Tetra-Py<sup>+</sup>-Me was dependent on bacteria external structures. Although all Gram-positive bacteria were inactivated to the detection limit (reduction of ~8 log) after 60–180 min of irradiation, the inactivation followed distinct patterns. Among the Gram-negative bacteria, *E. coli* was the only species to be inactivated to the detection limit (~8 log after 180 min). The efficiency of inactivation of the two species of *Aeromonas* was similar (reduction of ~5–6 log after 270 min). *Rhodopirellula* was less susceptible (reduction of ~4 log after 270 min). As previously observed, the Gram-positive bacteria are more easily inactivated than Gram-negative strains, and this is even true for *T. radlovictrix*, *D. geothermalls* and *D. radiodurans*, which have a complex multi-layered cell wall. The results support the theory that the outer cell structures are major bacterial targets for PDI. Moreover, the chemical composition of the external structures has a stronger effect on PDI efficiency than complexity and the number of layers of the external coating, and lipids seem to be an important target of PDI.

Received 29th November 2013,

Accepted 16th January 2014

DOI: 10.1039/c3pp50408e

www.rsc.org/ppa

## Capítulo 2

# Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin



## 2.1 Introduction

Antimicrobial photodynamic inactivation (PDI) has recently been used to inactivate efficiently microorganisms; this approach can help address the increasing problem of conventional microbial therapies associated with resistance against antibiotics and the concern about their spreading into the environment. The PDI procedure combines a photosensitizer (PS), light and oxygen leading to the formation of cytotoxic species (singlet oxygen and free radicals) that destroy these microorganisms. This technique has been shown to be effective *in vitro* against bacteria (including drug-resistant strains), yeasts, viruses and protozoa.<sup>22,23,28,71</sup>

In spite of the multi-target nature of PDI it is generally accepted that the main targets in bacteria are the external structures, cytoplasmic membrane and cell walls<sup>5-72,73</sup> and not the nucleic acids.<sup>5,48,52,54</sup> The damages to the external microbial structures can involve leakage of cellular contents or inactivation of membrane transport systems and enzymes.<sup>46,47</sup>

Assuming that the main targets of PDI in microorganisms are the external structures, the photosensitizer (PS) does not need to reach the intracellular compartment since specific and proper adhesion to those structures is adequate for its lightactivated destruction. As a consequence, the probability of resistance development in target organisms by blocking uptake, increasing metabolic detoxification or increasing the export of the drug is minimal.<sup>21</sup> All studies that tested the possible development of microbial resistance to PDI proved that, as first hypothesized, microorganisms are not able to develop resistance.<sup>6,74,75</sup>

A pattern of PDI susceptibility of Gram-positive and Gram-negative bacteria has long been reported. Neutral and anionic PS can efficiently destroy Gram-positive bacteria because their cell wall is easily crossed by all types of PSs. However, these PSs are inefficient against Gram-negative bacteria.<sup>38,76</sup> Nevertheless, many neutral and anionic PSs can become effective against Gram-negative bacteria if they are co-administrated with the outer membrane disrupting agents such as CaCl<sub>2</sub>, EDTA or polymixin B nonapeptide which are able to promote electrostatic repulsion with destabilization of the cell wall constituents.<sup>7,36,37,77</sup> A direct and efficient inactivation of Gram-negative bacteria can be achieved with cationic PSs which interact with the constituents of the outer membrane of the cell wall, facilitating cell binding.<sup>24,25,38-40</sup>

Most of the Gram-positive bacteria have cell walls constituted by peptidoglycan layers, intimately closely associated with lipoteichoic and negatively charged teichuronic acids, which display a relatively high degree of porosity. Macromolecules

with a molecular weight of 30 000-60 000 (glycopeptides and polysaccharides) can readily diffuse to the cytoplasmic membrane, which does not act as a permeability barrier for the most commonly used PS,<sup>78</sup> for which molecular weights generally do not exceed 1500-1800 Da.<sup>8</sup> In contrast, most of the Gram-negative bacteria contain an additional highly organized outer membrane in the cell wall, located externally to the peptidoglycan layer. The outer membrane shows an asymmetric structure composed of strong negatively charged lipopolysaccharides (LPS), phospholipids, lipoproteins and proteins with porin function.<sup>17</sup> Such a highly organized structure excludes the penetration of several classes of molecules, but hydrophilic 600-700 Da molecules can still diffuse through the porin channel.<sup>63</sup> However, important differences between the photoinactivation profiles within sets of Gram-positive<sup>79-81</sup> or Gram-negative bacteria<sup>39,57,82-84</sup> are also largely reported in the literature.

As stated above, typical Gram-positive bacteria have a single lipid bilayer (monoderm bacteria) and typical Gram-negative bacteria have two lipid bilayers (diderm bacteria). Still, some bacterial taxa lack peptidoglycan and are considered to be Gram-variable. These typical Gram behaviours are not always observed. With the exception of *Firmicutes* (low CG Gram-positives), *Actinobacteria* (high CG Gram-positives) and the *Deinococcus-Thermus* group (Gram-positive, although structurally similar to Gram-negative bacteria with two layers), most bacteria are diderms and stain Gram-negative. Nevertheless, the members of the phylum *Chloroflexi* are monoderms and stain mostly Gram-negative.<sup>85</sup> Some *Firmicutes* species, belonging to the class *Mollicutes*, which lack peptidoglycan, do not stain as Gram-positive (Gram-indeterminate), and the class *Negativicutes* stains Gram-negative.<sup>86</sup> Additionally, a number of bacterial taxa (e.g. *Negativicutes*, *Fusobacteria*, *Synergistetes* and *Elusimicrobia*) that are either part of the phylum *Firmicutes* or branch in its proximity, have a diderm cell structure.<sup>85-87</sup> These atypical bacterial Gram-behaviors are due to the organization of the external structures.

The effect of these Gram-positive and Gram-negative unusual external characteristics on the efficiency of photoinactivation is not yet known. The aim of this study was to evaluate how the external bacterial structures influence the efficiency of PDI of 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me), a well-known standard PS.<sup>26,27,57,60-62</sup> To reach this objective, eight bacteria with distinct external structures were selected. The Gram-negative set included *Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* and *Rhodopirellula*. The Gram-positive representatives selected were *Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus geothermalis* and *Truepera radiovictrix*. Within the set of

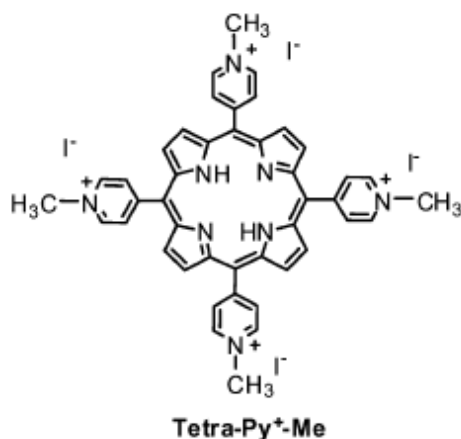


Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* presents a typical Gram-negative external structure constituted by two layers. *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila* have a regularly ordered crystalline S-layer as the outermost cell wall component, attached to the outer membrane layer. *Rhodopirellula* sp., a Gram-negative *Planctomycetes* with morphologically unique properties and intracellular compartmentalization, displays a peptidoglycan-lacking proteinaceous cell wall, without liposaccharides, exhibiting crateriform structures.<sup>88-90</sup> The cytoplasm is divided by an intracytoplasmic membrane into two major compartments: the peripheral ribosome-free paryphoplasm and the inner ribosome-containing riboplasm enclosing the nucleoid DNA.<sup>91,92</sup> Within the Gram-positive set, *Staphylococcus aureus* presents typical Gram-positive external structures with a single layer. *Truepera radiovictrix*, *Deinococcus geothermalis* and *Deinococcus radiodurans* display a thick cell wall that gives them Gram-positive behaviour, but have also a second complex multi-layered membrane and therefore are structurally closer to Gram-negative bacteria. The cell coating of *D. radiodurans* consists of at least five layers: (i) the cytoplasmic membrane, (ii) the rigid peptidoglycan-containing holey layer (Work and Griffiths, 1968), (iii) the compartmentalized layer, (iv) the interior layer, and (v) the fragile soft layer, containing hexagonally packed subunits.<sup>69,70</sup> *D. geothermalis* is surrounded by a three-layered cytoplasmic membrane, which is enclosed by a cell wall that has a corrugated surface and an electron-dense inner layer.<sup>93</sup> *T. radiovictrix* shows a symmetric triple-layered cytoplasmic membrane and a cell wall with three layers.<sup>67</sup> All attempts to identify peptidoglycan in *T. radiovictrix* have failed.<sup>67</sup>

## 2.2 Methods

### 2.2.1 Photosensitizer

The cationic derivative 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) was synthesized and characterized according to the literature.<sup>94</sup> Porphyrin purity was confirmed by thin layer chromatography and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The stock solution (500 µM) was prepared in dimethyl sulfoxide and sonicated for 30 min before use. The molecular structure of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me is illustrated in Fig. 5. Tetra-Py<sup>+</sup>-Me in DMSO: λ<sub>max</sub> (log ε) 425 (5.46), 516 (4.30), 550 (3.78), 588 (3.86), 644 (3.34) nm.



**Fig 5** - Structure of the porphyrin used as photosensitizer in the photoinactivation tests.

### 2.2.2 Bacterial strains and growth conditions

Bacteria strains from fresh cultured plates were inoculated in liquid medium and grown aerobically under 130 rpm. Then, an aliquot was transferred into fresh liquid medium under the same growth conditions to reach the early stationary phase ( $\sim 10^{8-9}$  colony forming units (CFU)  $\text{mL}^{-1}$ ). *E. coli* ATCC 13706, *Aeromonas salmonicida*,<sup>95</sup> *Aeromonas hydrophila* strain ATTC 7966 and *Staphylococcus aureus*<sup>96</sup> grew overnight in tryptic soy broth (TSB) at 37 °C. *Rhodopirellula* sp. strain LF2<sup>97</sup> grew for 48 h in Verrucomicrobium medium (M13 medium) at 25 °C. *Deinococcus radiodurans*<sup>98</sup> grew for 72 h in M13 medium at 30 °C. *Deinococcus geothermalis*<sup>68</sup> and *Truepera radiovictrix*<sup>67</sup> grew for 48 h in M13 medium at 50 °C.

### 2.2.3 Photoinactivation assays

Bacterial cultures, from the early stationary phase cultures, were tenfold diluted in PBS to a final concentration of  $\approx 10^{7-8}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . The diluted bacterial suspensions were distributed in 250 mL beakers (final volume of 15 mL per beaker), incubated in the dark with 5.0  $\mu\text{M}$  of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me for 15 min at 25 °C under 100 rpm stirring, in order to promote the PS binding to cells, and then irradiated by light using an illumination system, formed by 13 parallel OSRAM 21 lamps each one with 18 W, with an irradiance of 40  $\text{W m}^{-2}$ , emitting in the range of 380-700 nm. Bacterial suspensions were irradiated up to 270 min (total light dose of 64.8  $\text{J cm}^{-2}$ ) and subsamples of 1.0 mL were collected at the beginning of the irradiation (time 0) and after 15, 30, 60, 90, 180 and 270 min of exposure to light. After each photosensitization period, the cells were serially diluted in PBS, pour-plated in solid medium (as indicated above per bacterium) and incubated, according to the conditions described above, for viability monitoring.

The cell viability was determined by counting the CFU on the most appropriate dilution. Control samples were included in all PDI experiments: light control (LC) consisted of a bacterial suspension that was exposed to light; and dark control (DC) consisted of a bacterial suspension incubated with PS under the same conditions as the samples, but protected from light. Three independent experiments were conducted, with two replicates each.

#### 2.2.4 Porphyrin cellular uptake

A bacterial suspension ( $10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) was incubated for 15 min in the dark at room temperature in the presence of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me at the same concentration used in the inactivation studies (5.0  $\mu\text{M}$ ). The suspension was centrifuged at 17 000g for 15 min (Eppendorf Microcentrifuge 5414) and the pellets were then washed with 950  $\mu\text{L}$  of PBS and afterwards centrifuged under the same conditions in order to remove the unbound Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. For the digestion, the pellets were resuspended in 1 mL of a digestion solution of 0.1 M NaOH-2% sodium dodecyl sulfate<sup>61</sup> and incubated at room temperature for at least 24 h. The concentration of the Tetra-Py<sup>+</sup>-Me in the digested extracts was analyzed by fluorimetry with a Fluoromax 3 (Horiba Jobin Yvon). The samples were excited at 423 nm and the fluorescence emission of the PS was monitored in the 600-800 nm range. The measured fluorescence intensity allowed the determination of the corresponding concentration by interpolation with a calibration plot built with known concentrations of the Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Parallel aliquots of the bacteria incubated in the presence of the Tetra-Py<sup>+</sup>-Me were serially diluted and pour-plated for the determination of the concentration of viable bacteria (CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). The uptake values were obtained by dividing the number of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me molecule in the dissolved pellet by the number of CFU obtained by serial dilution, and in the calculation of the number of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me molecules per cell, Avogadro's number was used.<sup>44</sup> Three independent assays were performed, with three replicates each.

#### 2.2.5 Statistical analysis

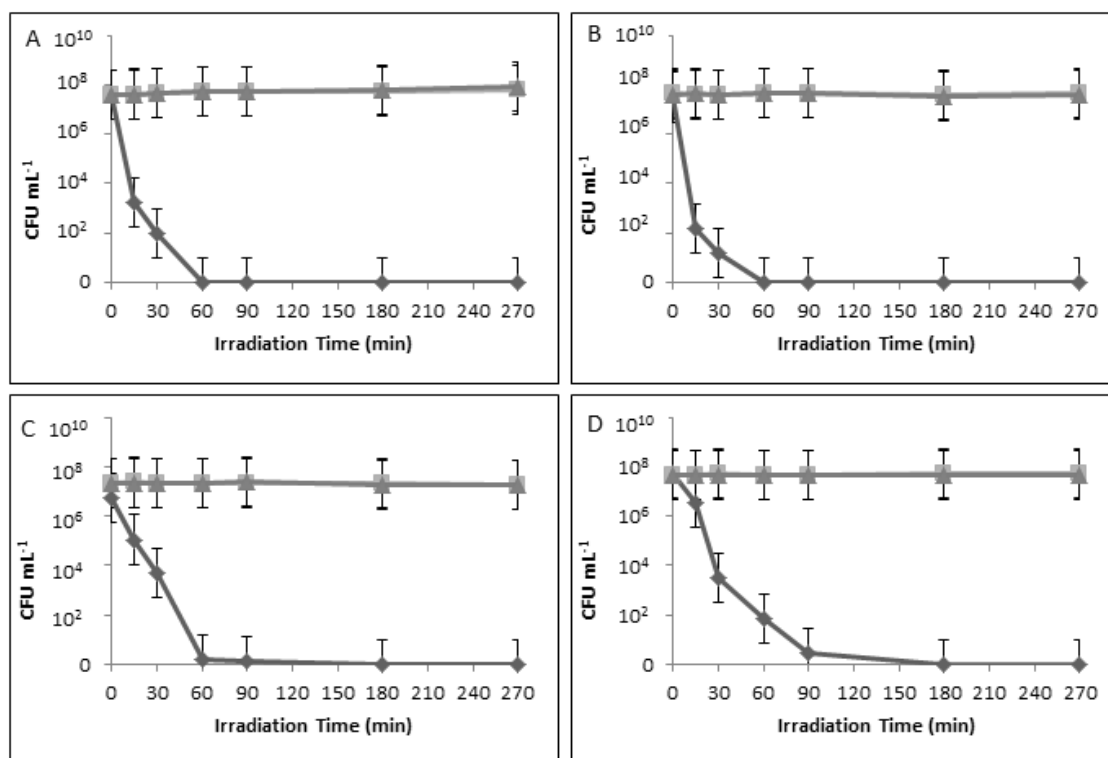
Statistical analyses were performed using SPSS (SPSS 15.0 for Windows, SPSS Inc., USA). Normal distributions were assessed by evaluating using the Kolmogorov-Smirnov test. The significance of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me and irradiation time on bacterial inactivation was assessed by the two-way univariate analysis of variance (ANOVA) model with the Bonferroni *post-hoc* test. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

## 2.3 Results

### 2.3.1 Photodynamic inactivation of bacterial cells

The results of the PDI experiments are summarized for the Gram-positive strains (*S. aureus*, *D. geothermalis*, *D. radiodurans* and *T. radiovictrix*) in Fig. 6, and for Gram-negative strains (*E. coli*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila* and *Rhodopirellula* sp.) in Fig. 7.

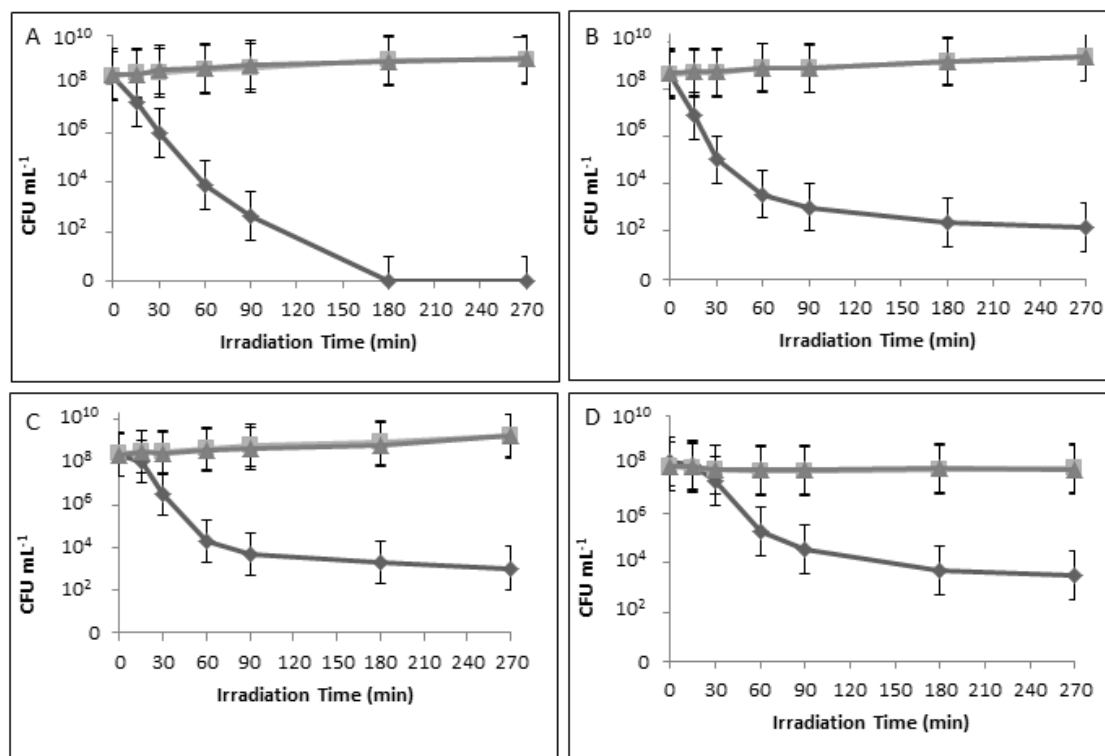
In all cases the light and dark controls show that the viability of Gram-negative and Gram-positive bacteria ( $\sim 8 \log \text{CFU mL}^{-1}$  stable) was neither affected by light alone nor by the Tetra-Py<sup>+</sup>-Me in the dark at 5.0  $\mu\text{M}$  (Fig. 6 and 7).



**Fig 6** - Variation of viability of *S. aureus* (A), *D. radiodurans* (B), *D. geothermalis* (C) and *T. radiovictrix* (D) after exposure to 5.0  $\mu\text{M}$  of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me and irradiated with white light (380-700 nm) with an irradiance of 40 W m<sup>-2</sup> during 270 min. Irradiated sample: —◆—. Light control: —■—. Dark control: —▲—.

The studies show that the tetracationic porphyrin selected, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, was effective against all the Gram-positive bacteria, causing approximately 8 log reduction on cell survival, after 60-180 min of exposure to white light (380-700 nm), with an irradiance of 40 W m<sup>-2</sup> (Fig. 6). The photoinactivation rate for Gram-negative bacteria (Fig. 7) was lower than that for Gram-positive bacteria and the photoinactivation required more time of irradiation (reduction of 4-8 log after 180-270 min).

All the Gram-positive strains were inactivated to the limits of detection (no colonies grew in 1 mL of undiluted sample) but the kinetics of inactivation varied between strains (Fig. 6) (ANOVA,  $p < 0.05$ ). For *S. aureus* and *D. radiodurans*, the inactivation was faster in the initial 15 min of irradiation, causing a significant decrease ( $p < 0.05$ ) of 4.4 log and 5.4 log, respectively (Fig. 6A and 6B); in both cases the reduction of the cell viability to the limit of detection was attained after 60 min of irradiation. For *D. geothermalis* (reduction of 3.1 log) and *T. radiovictrix* (reduction of 4.2 log), a slower rate of inactivation was observed after 30 min of irradiation (Fig. 6C and 6D). However, although *D. geothermalis* required an irradiation time of 60 min to be fully inactivated, like *S. aureus* and *D. radiodurans*, the strain *T. radiovictrix* needed 180 min. Thus, the major difference in the PDI profiles among the Grampositive strains were observed in the first 15 and 30 min of irradiation ( $p < 0.05$ ).



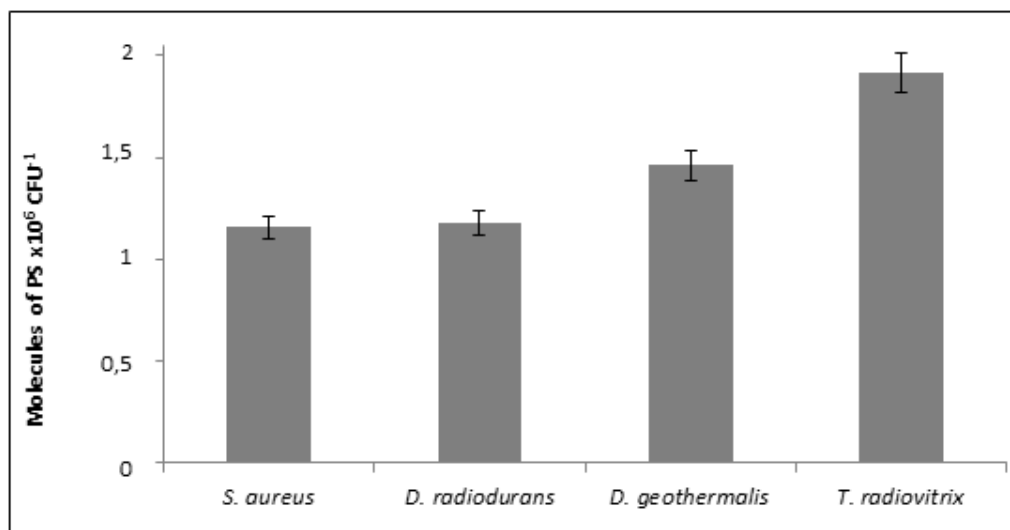
**Fig 7** - Variation of viability of *E. coli* (A), *A. salmonicida* (B), *A. hydrophila* (C) and *Rhodopirellula* sp. (D) after exposure to 5.0 µM of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me and irradiated with white light (380-700 nm) with an irradiance of 40 W m<sup>-2</sup> during 270 min.

Irradiated sample: —◆—. Light control: —□—. Dark control: —▲—.

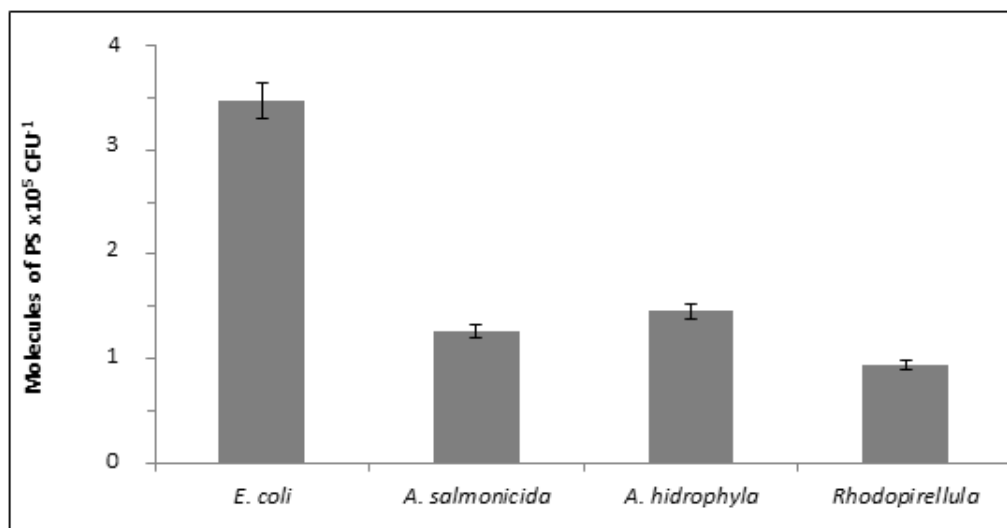
Among the Gram-negative bacteria, *E. coli* was the only strain that could be inactivated to the detection limit ( $\sim 8$  log after 180 min) under the PDI conditions used. The fastest reduction in cell viability occurred in the first 60 min of irradiation (4.5 log reduction) (Fig. 7) but the complete inactivation (to the limit of detection) of this strain was attained after 180 min of irradiation ( $p < 0.05$ ). The efficiency of inactivation of the two species of *Aeromonas* was similar (maximum reductions of 6.5 log for *A. salmonicida* and of 5.3 log for *A. hydrophila* after 270 min), but the inactivation kinetics revealed significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ ) in the first 60 min of irradiation (Fig. 7B and 7C). The inactivation was faster in the initial 30 min of irradiation, causing approximately a decrease of 3.6 log for *A. salmonicida* and of 1.9 log for *A. hydrophila* (Fig. 7B and 7C respectively), and then the rate decreased until 270 min of irradiation ( $p < 0.05$ ). *Rhodopirellula* sp. was shown to be the strain more resistant to photoinactivation (reduction of 4.7 log after 270 min of irradiation). The rate of inactivation was high in the initial 60 min of irradiation, causing approximately a decrease of 2.8 log (Fig. 7D), and continued, with a lower rate, until 180 minutes of irradiation ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.2 Cellular uptake of porphyrin

The results of the Tetra-Py<sup>+</sup>-Me cellular uptake by all the bacteria, obtained after 15 min of incubation in the dark with 5.0  $\mu\text{M}$  of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me followed by washing with PBS, are summarized in Figures 8 and 9.



**Fig 8** - Uptake of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me by Gram-positive bacteria (*S.aureus*, *D. radiodurans*, *D. geothermalis* and *T. radiovitrix*) after 15 min of dark incubation at 25 °C in the presence of 5.0  $\mu\text{M}$  of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me under stirring ( $\sim 100$  rpm).



**Fig 9** - Uptake of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me by Gram-negative bacteria (*E. coli*, *A. salmonicida*, *A. hydrophyla* and *Rhodopirellula*) after 15 min of dark incubation at 25°C in the presence of 5.0 µM of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me under stirring (~100 rpm).

The studies have shown that the amounts of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me retained by Gram-positive and Gram-negative bacteria are different ( $p < 0.05$ ), varied for Gram-positive between  $1.2 \times 10^6$  (*S. aureus*) and  $1.9 \times 10^6$  molecules CFU<sup>-1</sup> (*T. radiovictrix*) (Fig. 8), whereas that for Gram-negative bacteria varied between  $1.0 \times 10^5$  (*Rhodopirellula*) and  $3.5 \times 10^5$  (*E. coli*) molecules CFU<sup>-1</sup> of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (Fig. 9). The Gram-negative *Aeromonas* showed similar PS retention ( $p > 0.05$ ); however the Gram positive species *D. geothermalis* showed higher ( $p < 0.05$ ) retention than *D. radiodurans*.

## 2.4 Discussion

Knowing that the photodynamic inactivation (PDI) of bacteria is nowadays considered to be an important and efficient alternative to more conventional approaches, we decided in this study to evaluate how Tetra-Py<sup>+</sup>-Me efficiency is affected by the different composition/organization of bacterial external structures. This information will be useful to establish the best PDI protocol for each microorganism.

The results from the present study indicate that: (1) the composition/organization of bacterial external structures influence the efficiency of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me; (2) the chemical composition of the external structures seems to affect more the PDI efficiency than the complexity and the number of layers of the external coating; (3) lipids seem to be an important target.

It is well-known that three of the Gram-positive bacteria tested (*D. radiodurans*, *D. geothermalis* and *T. radiovictrix*) are characterized by having rapid and efficient DNA repair mechanisms, and genomes in which nearly all the varieties of bacterial stress response proteins, namely against oxidative stress, are encoded. The results showed that these bacteria were inactivated with a similar efficiency to the one observed for *S. aureus*. This typical Gram-positive bacterium has a much less efficient DNA repair mechanism and a lower number of genes for proteins against oxidative stress.<sup>99</sup> Thus, if the DNA was the main target of the photodynamic treatment, the photoinactivation of *D. radiodurans*, *D. geothermalis* and *T. radiovictrix* would be less efficient than that of *S. aureus*. In another PDI study, but using a different type of PS, *D. radiodurans* was also easily inactivated.<sup>98</sup>

Our study shows that in the Gram-positive bacteria set the extent of cell inactivation was not directly related to the PS binding capacity. This suggests that the differences between the bacterial strain external structures affected the PS uptake and the PDI efficiency. Although it seems obvious that a greater PS accumulation on the cell could be directly correlated with PDI efficiency,<sup>100-102</sup> some studies have shown that this correlation can change<sup>48,103,104</sup> as we observed here. *T. radiovictrix*, despite showing the highest PS uptake, 22-35% higher than that of either *Deinococcus* or *Staphylococcus*, was shown to be less susceptible to PDI than the former bacteria, requiring a longer irradiation time to be fully inactivated (180 min versus 60 min).

Among the tested Gram-negative bacteria, *Rhodopirellula* was shown to be the less susceptible strain to PDI, followed by the *Aeromonas* strains and finally by *E. coli* which was the most vulnerable one. The external structures of *Rhodopirellula* are similar to those of *Aeromonas* but are very different from those of *E. coli*, which was the only Gram-negative bacterium that was fully inactivated under our experimental conditions. *A. salmonicida*, *A. hydrophila* and *Rhodopirellula* sp.<sup>105</sup> presented a proteinaceous layer attached to the outer membrane as the outermost cell wall component while *E. coli* presents a typical Gram-negative cell structure (two layers with the outermost cell layer constituted by lipopolysaccharide (LPS), phospholipids, lipoproteins and porin proteins). In *A. salmonicida*, the S-layer is a two-dimensional paracrystalline tetragonal array of a single protein species, the A protein, which covers the entire bacterial cell, and binds to the O-antigen of the *A. Salmonicida* lipopolysaccharide (LPS).<sup>106</sup> The S-layer protein (A-protein) of *A. salmonicida* increases the surface hydrophobicity and provides constitutive protection against oxidative damage<sup>107,108</sup> and it may be a primary factor of cell survival during PDI by the cationic PS. In a previous study it has been found that protein A has a hydrophobic binding



domain with less affinity to hematoporphyrin (which contains hydroxyl groups) than for protoporphyrin IX (bearing vinyl groups).<sup>109</sup> The presence of such an S-layer in *A. salmonicida* can probably explain the lower PDI efficiency of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (water soluble PS), in comparison with the *E. coli*. In fact the uptake of the hydrophilic Tetra-Py<sup>+</sup>-Me by *A. salmonicida* cells was approximately 36% of that calculated for *E. coli*. Although the hydrophobic amino acid content of the *A. hydrophila* protein was lower than that of *A. salmonicida* protein, leading consequently to differences in surface structure of *A. hydrophila*, its S-layer is still unable to bind hemin (the iron(II) complex of protoporphyrin IX).<sup>110</sup>

The uptake of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me by *A. hydrophila* cells was similar to that observed for *A. salmonicida* (43% of that of *E. coli*). To the best of our knowledge, the relation between surface hydrophobicity and PS binding for *Rhodopirellula* is not known. The uptake of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me by *Rhodopirellula* cells was also low (29% of *E. coli*), even in comparison with *Aeromonas*.

Considering the results obtained with the two sets of bacteria (Gram-positive and Gram-negative), the chemical composition of the external structures seems to have a more important effect on susceptibility to PDI than the number of cell coating layers. In the present study, three Gram-positive bacteria which have a complex multi-layered cell wall (5 layers) were similarly or only slightly less inactivated than a Grampositive bacterium with a typical monolayer cell wall. The pattern of inactivation of *D. radiodurans* was more similar to that of *S. aureus* than to that of *D. geothermalis* that belongs to the same genus or to *T. radiovictrix*, included in the same phylum as *Deinococcus*, but in a different family (*Trueperaceae*). The three Gram-negative bacteria that display a proteinaceous layer as the outermost cell wall component have a similar PDI pattern; they were less inactivated than the Gram-negative bacterium *E. coli* with a typical double layer cell wall.

The results of this study suggest that lipids can be an important target of PDI. The Gram-positive *D. radiodurans* and *D. geothermalis* bacteria showed different patterns of photoinactivation, namely after 15 and 30 min of irradiation. Both species have five external layers, being their lipid composition the main difference between the two strains. The membrane lipids of *D. radiodurans* contain 43% of phosphoglycolipids with alkylamines as structural components, which are considered unique to *D. radiodurans*<sup>111</sup> and common bacterial phospholipids are absent in this bacterium.<sup>112</sup> The lipoproteins contain mainly even-number, straight-chain, saturated and monounsaturated fatty acids, being the palmitoleate chain the predominant one;<sup>113</sup> also a significant amount of odd-numbered fatty acids is present.<sup>114</sup> Polyunsaturated and

branched-chain fatty acids are not detectable in this strain. *D. geothermalis* possesses membranes with very low levels of unsaturated fatty acids compared to *D. radiodurans*, and the fatty acids of *D. geothermalis* are primarily branched-chain fatty acids.<sup>68</sup> It is well known that lipids can be modified by oxidative reactions leading to structural changes and loss of function.<sup>115-119</sup> The effects can extend to the surrounding environment affecting membrane structures and ultimately compromising cell viability. It is also clear that saturated fatty acids are not prone to oxidation, but monounsaturated as well as polyunsaturated ones can be modified by oxidation.<sup>117-120</sup> The difference in PDI susceptibility of the two strains of *Deinococcus*, which is quite obvious after 15 and 30 min of irradiation (Fig. 6B and 6C), can be due to the lower proportion of unsaturated fatty acids in *D. geothermalis* and to the predominance of primarily saturated and branched-chain fatty acids in this species, compared to *D. radiodurans*. Recent studies by Alves *et al*<sup>117,118</sup> show that although bacterial lipids include mainly monounsaturated fatty acids, membrane lipids of Gram-positive and Gram-negative bacteria are important molecular targets of the photoinactivation process induced by porphyrins. The overall modification in the relative amount of lipids and the accumulation of lipid oxidation products, such as hydroxide and hydroperoxide derivatives, underlies the lethal damage of photosensitized bacterial cells. The pattern of inactivation of *T. radiovictrix* was also different from that of the two species of *Deinococcus*. *T. radiovictrix* was less inactivated during the first 60 min of irradiation and this fact can be probably due to predominance of saturated branched acids present in the complex mixture of glycolipids and phospholipids of *Truepera*.

The results of this work indicate that in the presence of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, lipids can be important bacterial targets of PDI when compared with proteins. A similar result was already obtained when the phenothiazine dye toluidine blue was used as PS.<sup>121</sup> It is well known that lipids are more easily modified by oxidation than proteins.<sup>122</sup> The Gram-negative bacteria *E. coli*, with a typical cell wall, was much more efficiently inactivated than the other three Gram-negative bacteria with a proteinaceous layer as the outermost cell wall component. *E. coli* external structures consist of two membranes: an inner cytoplasmic membrane composed of a symmetrical lipid bilayer and an outer membrane composed of an asymmetrical lipid bilayer with lipopolysaccharide (LPS). Between the inner and outer membranes, the gel-like space called the periplasm contains a thin layer of peptidoglycan. As stated before, the S-layer protein of *Aeromonas*, such as the proteinaceous layer of *Rhodopirellula*, provides constitutive protection against oxidative damage.<sup>107,108</sup> An unusually high proportion of the genome of *Rhodopirellula* encoded proteins for which no function could be reliably predicted.

Proteome data suggest that these genes of unknown functions are most probably involved in the global stress response.<sup>123</sup> Moreover, *Rhodopirellula* that has no liposaccharides in the cell wall was less inactivated than the two *Aeromonas* species, in which liposaccharides are present. Additionally, it is already known for viruses that it is easier to inactivate enveloped viruses by PDI than non-enveloped viruses;<sup>124,125</sup> that is, viruses with lipids in the external structure are more susceptible to PDI than viruses without lipids. The full photoinactivation of *E. coli*, which has more lipids in the outer membrane than the other three Gram-negative bacteria (which have an external protein layer), suggests also the importance of lipids on the external membrane for an efficient PDI. As the typical Gram-positive bacteria, *S. aureus*, has a porous peptidoglycan layer as external coating, the lipids of the cytoplasmic membrane are likely to be accessible as PDI targets. The other Gram-positive bacteria, the atypical ones, even the *Truepera*, which has no peptidoglycan layer, have a high content of lipids in the external structures which can explain their full photoinactivation by Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. However, for human cells, it has been indicated that proteins are more important targets of PDT than lipids which can be due to the fact that human membranes have zwitterionic bilayers of lipids,<sup>126,127</sup> but bacterial cells have negatively charged lipid bilayers.<sup>128,129</sup>

In this study we can conclude that bacterial external structures are the main targets of PDI which is in line with previous studies.<sup>8,38</sup> The modification of the bacterial cell outer Wall that seems to occur in the early stages of photosensitised processes can facilitate the penetration of the PS and/or <sup>1</sup>O<sub>2</sub> to inner cellular districts (mainly the plasma membrane). These findings reinforce the importance of the chemical composition of bacteria external structures in order to understand the cellular and molecular basis of antimicrobial PDI. This is still an unexplored field that deserves further research.



## Referências

---



1. H. Von Tappeiner and A. Joldbauer, Die sensibilisierende wirkung fluorieszierender substanzer. Gesamnte untersuchungen uber die photodynamische erscheinung, 1907, Leipzig, F. C. W. Vogel.
2. T. J. Dougherty, C. J. Gomer *et al.*, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90, 12, 889-905.
3. R. Bonnett, Chemical aspects of photodynamic therapy, in *Advanced Chemistry Texts*, Gordon and Breach Science, Amsterdam, 2000, 1, 324.
4. M. Wainwright, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT): A review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998, 42, 13-28.
5. M. R. Hamblin and T. Hasan, Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, 3, 436-450.
6. A. Tavares, C. M. B. Carvalho, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, J. P. C. Tomé, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, N. C. M. Gomes, E. Alves and A. Almeida, Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment, *Mar. Drugs*, 2010, 8, 91.
7. G. Jori and S. B. Brown, Photosensitized inactivation of microorganisms, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, 3(5), 403-405.
8. G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppelotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti and G. Roncucci, Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications, *Lasers Surg. Med.*, 2006, 38(5), 468-481.
9. Z. Luksiene, New Approach to Inactivation of Harmful and Pathogenic Microorganisms by Photosensitization, *Food. Technol. Biotechnol.*, 2005, 43, 411-418.
10. H. Von Tappeiner and A. Jesionek, Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen, *Muench. Med. Wochenschr.*, 1903, 47, 2042-2044.
11. M. J. F. Calvete and A. T. P. C. Gomes, Chlorins in Photodynamic Therapy – Synthesis and applications, *Rev. Virtual Quim.*, 2009, 1, 92.
12. C. Gomer, Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, 1991, 54, 1093-1107.
13. J. Moser, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation photosensitizers, 1998, Amsterdam, Harwood Academic Publishers
14. N. Bressler and S. Bressler, Photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne): impacto n ophthalmology and visual sciences, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, 41, 624-628.

15. R. C. Souza, J. C. Junqueira, R. D. Rossoni, C. A. Pereira, E. Munin and A. O. C. Jorge, Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*, *Lasers Med. Sci.*, 2010, 25, 385-389.
16. F. Foschi, C. R. Fontana, K. Ruggiero, R. Riahi, A. Vera, A. G. Doukas, T. C. Pagonis, R. Kent, P. P. Stashenko and N. S. Soukos, Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*, *Lasers Surg. Med.*, 2007, 39, 782-787.
17. T. Maisch, R. M. Szeimies, G. Jori and C. Abels, Antibacterial photodynamic therapy in dermatology, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004 (3), 907-917.
18. G. Cassel and J. Mekalanos, Development of antimicrobial agentes in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance, *J. Am. Med. Assoc.*, 2001, 285, 601-605.
19. F. Perez, R. Salata and R. Bonomo, Current and novel antibiotics against resistant Gram-positive bacteria, *Infect. Drug Resist.*, 2008, 1, 27-44.
20. B. A. Cunha, Antibiotic resistance. Control strategies. *Crit. Care Clin.*, 1998, 14, 309-327.
21. K. D. Winckler, Special section: Focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT), *J. Photochem. Photobiol.*, B, 2007, 86, 43-44.
22. L. Costa, E. Alves, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. F. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha and A. Almeida, Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, 7, 415-422.
23. E. Alves, L. Costa, C. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha and A. Almeida, Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins, *BMC Microbiol.*, 2009, 9, 70-83.
24. M. Merchat, G. Bertolini, P. Giacomini, A. Villanueva and G. Jori, Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 1996, 32(3), 153-157.
25. M. Jemli, Z. Alouini, S. Sabbahi and M. Gueddari, Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers, *J. Environ. Monit.*, 2002, 4(4), 511-516.
26. E. Alves, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, S. Mendo and A. Almeida, Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by



- cationic porphyrins under artificial and solar irradiation, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 35(11), 1447-1454.
27. A. Oliveira, A. Almeida, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro and Â. Cunha, Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores, *J. Appl. Microbiol.*, 2009, 106(6), 1986-1995.
28. A. Almeida, Â. Cunha, M. A. F. Faustino, A. C. Tomé and M. G. P. M. S. Neves, Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents, in *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, ed. M. R. Hamblin and G. Jori, *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 2011, pp. 83-160, ISBN: 978-1-84973-144-7. ISSN: 2041-9716.
29. R. Bonnett, M. A. Krysteva, I. G. Lalov and S. V. Artarsky, Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan, *Water Res.*, 2006, 40, 1269-1275.
30. C. M. B. Carvalho, A. T. P. C. Gomes, S. C. D. Fernandes, A. C. B. Prata, M. A. Almeida, M. A. Cunha, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Z. Lin, J. P. Rainho and J. Rocha, Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial  $\beta$ -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process, *J. Photochem. Photobiol*, 2007, 88, 112-118.
31. C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, L. Costa, E. Alves, A. Oliveira, Â. Cunha and A. Almeida, Antimicrobial photodynamic activity of porphyrin derivatives: potential application on medical and water disinfection, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2009, 13, 574-577.
32. L. R. Milgrom, The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds, *Oxford University Press*, New York, 1997.
33. M. Athar, H. Mukhtar and D. R. Bickers, Differential Role of Reactive Oxygen Intermediates in Photofrin-I- and Photofrin-II-Mediated Photoenhancement of Lipid Peroxidation in Epidermal Microsomal Membranes, *J. Invest. Dermatol.*, 1988, 90, 652-657.
34. R. F. Donnelly, P. A. McCarron and M. M. Tunney, Antifungal photodynamic therapy: A review, *Microbiol. Res.*, 2008, 163, 1-12.
35. M. C. Gomes, S. M. Woranovicz-Barreira, M. A. F. Faustino, R. Fernandes, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, N. C. M. Gomes, A. Almeida, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha and J. P. C. Tomé, Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins, *J. Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, 10, 1735.

36. Z. Malik, H. Ladan and Y. Nitzan, Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 1992, 14(3), 262-266.
37. B. Ehrenberg, Z. Malik, Y. Nitzan, H. Ladan, F. Johnson, G. Hemmi and J. Sessler, The binding and photosensitization effects of tetrabenzoporphyrins and texaphyrin in bacterial cells, *Lasers Med. Sci.*, 1993, 8(3), 197-203.
38. M. R. Hamblin, D. A. O'Donnell, N. Murthy, K. Rajagopalan, N. Michaud, M. E. Sherwood and T. Hasan, Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 49(6), 941-951.
39. S. Banfi, E. Caruso, L. Buccafurni, V. Battini, S. Zazzaron, P. Barbieri and V. Orlandi, Antibacterial activity of tetraarylporphyrin photosensitizers: an *in vitro* study on Gram-negative and Gram positive bacteria, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 2006, 85(1), 28-38.
40. M. Merchat, J. D. Spikes, G. Bertoloni and G. Jori, Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by mesosubstituted cationic porphyrins, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 1996, 35(3), 149-157.
41. D. Lazzeri, M. Rovera, L. Pascua and E. N. Durantini, Photodynamic Studies and Photoinactivation of *Escherichia coli* Using meso-Substituted Cationic Porphyrin Derivatives with Asymmetric Charge Distribution, *J. Photochem. Photobiol.*, 2004, 80, 286-293.
42. D. Lopes, T. Melo, N. Santos, E. Alves, M. C. Gomes, Â. Cunha, M. G. P. M. S. Neves, M. A. F. Faustino, M. R. M. Domingues and A. Almeida, Evaluation of the interplay among the charge of porphyrinic photosensitizers, lipid oxidation and photoinactivation efficiency in *Escherichia coli*, *J. Photochem. Photobiol.*, 2014, 141, 145-153.
43. M. B. Spesia, D. Lazzeri, L. Pascual, M. Rovera and E. N. Durantini, Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005, 44, 289-295.
44. T. N. Demidova and M. R. Hamblin, Photodynamic inactivation of Bacillus spores, mediated by phenothiazinium dyes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(11), 6918-6925.
45. Y. Nitzan, A. Balzam-Sudakevitz and H. Ashkenazi, Eradication of *Acinetobacter baumannii* by photosensitized agents *in vitro*, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 1998, 42, 211-218.

46. H. D. Li, O. S. Fedorova, A. N. Grachev, W. R. Trumble, G. A. Bohach and L. Czuchajowski, A series of meso-tris-(N-methyl-pyridiniumyl)-(4-alkylamidophenyl) porphyrins: Synthesis, interaction with DNA and antibacterial activity, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1354, 252-260.
47. S. Mettath, B. R. Munson and R. K. Pandey, DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position, *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10(1), 94-102.
48. E. Alves, M. A. Faustino, J. P. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, N. C. M. Gomes and A. Almeida, Nucleic acid changes during photodynamic inactivation of bacteria by cationic porphyrins, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 4311-4318.
49. R. J. Fiel, N. Datta-Gupta, E. H. Mark, et al., Induction of DNA Damage by Porphyrin Photosensitizers, *Cancer Research*, 1981, 41, 3543-3545.
50. G. Bertoloni, F. M. Lauro, G. Cortella and M. Merchat, Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1475, 169-174.
51. F. P. Imray and D. G. MacPhee, The Role of DNA Polymerase I and the rec System in Survival of Bacteria and Bacteriophages Damaged by the Photodynamic Action of Acridine Orange, *Molec. Gen. Genet.*, 1973, 123, 289-298.
52. E. N. Durantini, Photodynamic inactivation of bacteria, *Curr. Bioact. Compd.*, 2006, 2, 127-142.
53. M. Schafer, C. Schmitz and G. Horneck, High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, 74, 249-253.
54. G. Valduga, B. Breda, G. M. Giacometti, G. Jori and E. Reddi, Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 256, 84-88.
55. K. F. Barker, Antibiotic Resistance: a current perspective, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 1999, 48, 109-124.
56. V. Albrecht and G. Burhard, Antimicrobial Photodynamic Therapy Compound and Method of Use, 2005, *US2005/0049228 A1*.
57. C. Arrojado, C. Pereira, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, R. Calado, N. C. M. Gomes and A. Almeida, Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture systems, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, 10, 1691-1700.

58. R. A. Garduño, A. R. Moore, G. Olivier, A. L. Lizama, E. Garduño and W. W. Kay, Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: Role of the S-layer, *Can. J. Microbiol.*, 2000, 46, 660-668.
59. B. Noonan and T. J. Trust, The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*, *FEMS Microbiol. Letters*, 1997, 154, 1-7.
60. C. Carvalho, A. Gomes, S. Fernandes, A. Prata, M. A. Almeida, M.Â. Cunha, J. Tomé, M. A. Faustino, M. G. Neves, A. Tomé, J. A. Cavaleiro, Z. Lin, J. Rainho and J. Rocha, Photoinactivation and rapid monitoring of Sewage Bacterial Assemblages in Wastewater by Neutral and Cationic Porphyrins, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 2007, 88, 112-118.
61. A. Tavares, S. R. S. Dias, C. M. B. Carvalho, M. A. F. Faustino, J. P. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, N. C. M. Gomes, E. Alves and A. Almeida, Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, 10(10), 1659-1669.
62. L. Costa, J. P. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, M. A. F. Faustino and A. Almeida, Susceptibility of non-enveloped DNA- and RNA-type viruses to photodynamic inactivation, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, 11(10), 1520-1523.
63. H. Nikaido, Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux, *Science*, 1994, 264, 382-388.
64. R. P. Fagan and N. F. Fairweather, Biogenesis and functions of bacterial S-layers, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, 12, 211-222.
65. H. Teeling, T. Lombardot, M. Bauer, W. Ludwig and F. O. Glöckner, Evaluation of the phylogenetic position of the planctomycete '*Rhodopirellula baltica*' SH 1 by means of concatenated ribosomal protein sequences, DNA-directed RNA polymerase subunit sequences and whole genome trees, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, 54, 791-801.
66. F. O. Glöckner, M. Kube, M. Bauer, H. Teeling, T. Lombardot, W. Ludwig, D. Gade, A. Beck, K. Borzym, K. Heitmann, R. Rabus, H. Schlesner, R. Amann, and R. Reinhardt, Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 14, 8298-8303.
67. L. Albuquerque, C. Simões, M. F. Nobre, N. M. Pino, J. R. Battista, M. T. Silva, F. A. Rainey and M. S. Da Costa, *Truepera radiovictrix* gen. nov., sp. nov., a new

- radiation resistant species and the proposal of *Trueperaceae* fam. nov. FEMS, *Microbiol. Lett.*, 2005, 247, 161-169.
68. A. C. Ferreira, M. F. Nobre, F. A. Rainey, M. T. Silva, R. Wait, J. Burghardt, A. P. Chung and M. S. da Costa, *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47(4), 939-947.
69. P. Lancy Jr. and R. G. Murray, The envelope of *Micrococcus radiodurans*: isolation, purification, and preliminary analysis of the wall layers, *Can. J. Microbiol.*, 1978, 24, 162-176.
70. E. Work and H. Griffiths, Morphology and chemistry of cell walls of *Micrococcus radiodurans*, *J. Bacteriol.*, 1968, 95, 641-657.
71. S. Kosaka, O. Akilov, K. O'riordan and T. Hasan, A mechanistic study of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis, *J. Invest. Dermatol.*, 2007, 127, 1546.
72. A. N. Vzorov, D. W. Dixon, J. S. Trommel, L. G. Marzilli and R. W. Compans, Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by porphyrins, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 3917-3925.
73. A. Egyeki, G. Turoczy, Z. Majer, K. Toth, A. Fekete, P. Maillard and G. Csik, Photosensitized inactivation of T7 phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses: efficiency and mechanism of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1624, 115-124.
74. F. M. Lauro, P. Pretto, L. Covolo, G. Jori and G. Bertoloni, Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, 1, 468-470.
75. L. Costa, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, N. C. M. Gomes and A. Almeida, Study of viral resistance following repeated exposure to aPDT and of viability recovery, *Antiviral Res.*, 2011, 91, 278-282.
76. R. Bonnett, D. Buckley, T. Burrow, A. Galia, B. Saville and S. Songca, Photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines, *J. Mater. Chem.*, 1993, 3, 323-324.
77. A. Preuss, L. Zeugner, S. Hackbarth, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro and B. Roeder, Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer, *J. Appl. Microbiol.*, 2013, 114, 36.

78. C. Friedrich, D. Moyles, T. Beveridge and R. Hancock, Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44(8), 2086-2092.
79. R. Shawar and B. H. Cooper, Comparative kinetics of hematoporphyrin derivative uptake and susceptibility of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus faecalis* to photodynamic-action, *Photochem. Photobiol.*, 1990, 52(4), 825-830.
80. K. König, M. Teschke, B. Sigusch, E. Glockmann, S. Eick and W. Pfister, Red light kills bacteria via photodynamic action, *Cell Mol. Biol.*, 2000, 46, 1297-1303.
81. M. Grinholc, B. Szramka, J. Kurlenda, A. Graczyk and K. P. Bielawski, Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 2008, 90, 57-135.
82. Y. Nitzan, M. Gutterman, Z. Malik and B. Ehrenberg, Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins, *Photochem. Photobiol.*, 1992, 55(1), 89–96.
83. Y. Nitzan, H. M. Wexler and S. M. Finegold, Inactivation of anaerobic-bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin, *Curr. Microbiol.*, 1994, 29, 125-131.
84. M. Szpakowska, J. Reiss, A. Graczyk, S. Szmigielski, K. Lasocki and J. Grzybowski, Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to a photodynamic effect of the arginine hematoporphyrin derivative, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1997, 8, 23-27.
85. I. C. Sutcliffe, A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture, *Trends Microbiol.*, 2010, 18(10), 464-470.
86. H. Marchandin, C. Teyssier, J. Campos, H. Jean-Pierre, F. Roger, B. Gay, J. P. Carlier and E. Jumas-Bilak, *Negativicoccus succinicivorans* gen. Nov., sp. Nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family Veillonellaceae and description of Negativicutes classis nov., Selenomonadales ord. Nov. and Acidaminococcaceae fam. Nov. in the bacterial phylum Firmicutes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, 60(6), 1271-1279.
87. R. S. Gupta, Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes, *Anto. Leeuw.*, 2011, 100, 171-182.
88. E. König, H. Schlesner and P. Hirsch, Cell wall studies on budding bacteria of the Planctomyces/Pasteuria group and on a *Prosthecomicrobium* sp., *Arch. Microbiol.*, 1984, 138, 200-205.

- 
89. W. Liesack, H. König, H. Schlesner and P. Hirsch, Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group, *J. Arch. Microbiol.*, 1986, 145(4), 361–366.
90. S. J. Giovannoni, W. Godchaux III, E. Schabtach and R. W. Castenholz, Cell wall and lipid composition of *Isosphaera pallida*, a budding eubacterium from hot springs, *J. Bacteriol.*, 1987, 169, 2702-2707.
91. M. R. Lindsay, R. I. Webb and J. A. Fuerst, Pirellulosomes: a new type of membrane-bounded cell compartment in planctomycete bacteria of the genus *Pirellula*, *Microbiology*, 1997, 143, 739-748.
92. M. R. Lindsay, R. I. Webb, M. Strous, M. S. Jetten, M. K. Butler, R. J. Forde and J. A. Fuerst, Cell compartmentalization in planctomycetes: novel types of structural organization for the bacterial cell, *Arch. Microbiol.*, 2001, 175, 413-429.
93. M. Kolari, U. Schmidt, E. Kuismanen and M. S. Salkinoja-Salonen, Firm but Slippery Attachment of *Deinococcus geothermalis*, *J. Bacteriol.*, 2002, 184(9), 2473-2480.
94. C. M. B. Carvalho, E. Alves, L. Costa, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, A. Almeida, Â. Cunha, Z. Lin and J. Rocha, Functional cationic nanomagnet-porphyrin hybrids for the photoinactivation of microorganisms, *ACS Nano*, 2010, 4, 7133-7140.
95. C. Pereira, Y. J. Silva, A. L. Santos, Â. Cunha, N. C. M. Gomes and A. Almeida, Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: survival, host specificity and effect on bacterial community structure, *Mar. Drugs*, 2011, 9(11), 2236-2255.
96. A. Vieira, Y. J. Silva, Â. Cunha, N. C. M. Gomes, H. W. Ackermann and A. Almeida, Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: in vitro and ex vivo experiments, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, 31, 3241-3249.
97. O. M. Lage, J. Bondoso and F. Viana, Isolation and characterisation of Planctomycetes from the sediments of a fish farm wastewater treatment tank, *Arch. Microbiol.*, 2012, 194, 879-885.
98. C. V. Romão, E. P. Mitchell and S. McSweeney, The crystal structure of *Deinococcus radiodurans* Dps protein (DR2263) reveals the presence of a novel metal centre in the N-terminus, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, 11, 891-902.
99. H. Suzuki, T. Lefébure, P. P. Bitar and M. J. Stanhope, Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its

- newly described sister species *Staphylococcus simiae*, *BMC Genomics*, 2012, 13(38), 1-8.
100. M. Strakhovskaya, Y. N. Antonenko, A. Pashkovskaya, E. A. Kotova, V. Kireev, V. G. Zhukhovitsky, N. A. Kuznetsova, O. A. Yuzhakova, V. M. Negrimovsky and A. B. Rubin, Electrostatic binding of substituted metal phthalocyanines to enterobacterial cells: its role in photodynamic inactivation, *Biochemistry*, 2009, 74(12), 1305-1314.
  101. K. Komagoe, H. Kato, T. Inoue and T. Katsu, Continuous real-time monitoring of cationic porphyrin-induced photodynamic inactivation of bacterial membrane functions using electrochemical sensors, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, 10(7), 1181-1188.
  102. H. Kato, K. Komagoe, Y. Nakanishi, T. Inoue and T. Katsu, Xanthene dyes induce membrane permeabilization of bacteria and erythrocytes by photoinactivation, *Photochem. Photobiol.*, 2012, 88(2), 423-431.
  103. M. N. Usacheva, M. C. Teichert, Y. Usachev, C. Sievert and M. Biel, Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells, *Lasers Surg. Med.*, 2008, 40(1), 55-61.
  104. M. C. Gomes, S. Silva, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. Almeida, J. A. S. Cavaleiro, J. P. Tomé and Â. Cunha, Cationic galactoporphyrin photosensitisers against UV-B resistant bacteria: oxidation of lipids and proteins by  $^1\text{O}_2$ , *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013, 12(2), 262-271.
  105. T. Lombardot, M. Bauer, H. Teeling, R. Amann and F. O. Glöckner, The transcriptional regulator pool of the marine bacterium *Rhodopirellula baltica* SH 1 T as revealed by whole genome comparisons, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 242(1), 137-145.
  106. R. A. Garduño and W. W. Kay, Capsulated cells of *Aeromonas salmonicida* grown in vitro have different functional properties than capsulated cells grown in vivo, *Can. J. Microbiol.*, 1995, 41, 941-945.
  107. R. A. Garduño, M. A. Kuzyk and W. W. Kay, Structural and physiological determinants of resistance of *Aeromonas salmonicida* to reactive radicals, *Can. J. Microbiol.*, 1997, 43, 1044-1053.
  108. J. M. Karczewski, G. J. E. Sharp and C. J. Secombes, Susceptibility of strains of *Aeromonas salmonicida* to killing by cellfree generated superoxide anion, *J. Fish Dis.*, 1991, 14, 367-373.



109. W. W. Kay, B. M. Phipps, E. E. Ishiguro and T. J. Trust, Porphyrin binding by the surface array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*, *J. Bacteriol.*, 1985, 164, 1332-1336.
110. J. S. Dooley, W. D. McCubbin, C. M. Kay and T. J. Trust, Isolation and Biochemical Characterization of the S-Layer Protein from a Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Strain, *J. Bacteriol.*, 1988, 170(6), 2631-2638.
111. R. Anderson and K. Hansen, Structure of a novel phosphoglycolipid from *Deinococcus radiodurans*, *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 12219-12223.
112. M. J. Thornley, R. W. Horne and A. M. Glauert, The fine structure of *Micrococcus radiodurans*, *Arch. Microbiol.*, 1965, 51, 267-289.
113. E. Griffiths and R. S. Gupta, Identification of signature proteins that are distinctive of the *Deinococcus-Thermus* phylum, *Int. Microbiol.*, 2007, 10, 201-208.
114. V. A. Knivett, J. Cullen and M. J. Jackson, Odd-numbered fatty acids in *Micrococcus radiodurans*, *Biochem. J.*, 1965, 96, 2C-3C.
115. A. W. Girotti, Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 2001, 63, 103-113.
116. G. Stark, Functional consequences of oxidative membrane damage, *J. Membr. Biol.*, 2005, 205, 1-16.
117. E. Alves, T. Melo, C. Simões, M. A. F. Faustino, J. P. C. Tomé, M. G. P. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, G. Newton, P. Domingues, M. R. M. Domingues and A. Almeida, Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2013, 27, 1-12.
118. E. Alves, N. Santos, T. Melo, E. Maciel, L. Dória, M. A. F. Faustino, J. P. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, L. Helguero, P. Domingues, A. Almeida and M. R. M. Domingues, Photodynamic oxidation of *Escherichia coli* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2013, 21, 4311-4318.
119. T. Melo, N. Santos, D. Lopes, E. Alves, E. Maciel, M. A. F. Faustino, J. P. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, A. Almeida, P. Domingues, M. A. Segundo and M. R. M. Domingues, Photosensitized oxidation of phosphatidylethanolamines monitored by electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 2013, 48(12), 1357-1365.
120. J. A. Imlay, Pathways of oxidative damage, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2003, 57, 395-418.

121. M. N. Usacheva, M. C. Teichert, C. E. Sievert and M. A. Biel, Effect of Ca<sup>+</sup> on the photobactericidal efficacy of methylene blue and toluidine blue against gram-negative bacteria and the dye affinity for lipopolysaccharides, *Lasers Med. Sci.*, 2006, 38(10), 946-954.
122. E. Cabiscol, J. Tamarit and J. Ros, Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species, *Int. Microbiol.*, 2000, 3, 3-8.
123. P. Wecker, C. Klockow, A. Ellrott, C. Quast, P. Langhamme, J. Harder and F. O. Glöckner, Transcriptional response of the model planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1 T to changing environmental conditions, *BMC Genomics*, 2009, 10, 410-426.
124. F. Käsermann and C. Kempf, Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene, *Antiviral Res.*, 1997, 34, 65-70.
125. K. Müller-Breitkreutz, H. Mohr, K. Briviba and H. Sies, Inactivation of viruses by chemically and photochemically generated singlet molecular oxygen, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 1995, 30, 63-70.
126. J. A. Virtanen, K. H. Cheng and P. Somerharju, Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, 95, 4964-4969.
127. A. Hawrani, R. A. Howe, T. R. Walsh and C. E. Dempsey, Origin of low mammalian cell toxicity in a class of highly active antimicrobial amphipathic helical peptides, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 18636-18645.
128. J. E. Cronan, Bacterial membrane lipids: where do we stand?, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2003, 57, 203-224.
129. N. N. Mishra, G. Y. Liu, M. R. Yeaman, C. C. Nast, R. A. Proctor, J. McKinnell and A. S. Bayer, Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 526-531.